

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Chimie et Science du Vivant**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Simon Arragain

Thèse dirigée par **Dr. Mohamed Atta** et
co-dirigée par **Pr. Marc Fontecave**

Préparée au sein du **Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux**
dans l'**École Doctorale Chimie et Science du Vivant**

Insertion de soufre en biologie par voie radicalaire. Etude des méthylthiotransférases.

Thèse soutenue publiquement le **07 octobre 2011**
devant le jury composé de :

M^{me}. Clotilde Policar

Professeur à l'École Normale Supérieure de Paris, Rapporteur

Mr. Olivier Ploux

Professeur à l'ENSCP, Rapporteur

Mr. Franck Fieschi

Professeur à l'Université Joseph Fourier, Examineur

Mr. John Hunt

Professeur à l'Université de Columbia, Examineur

Mr. Marc Fontecave

Professeur au Collège de France, co-directeur

Mr. Mohamed Atta

Chercheur-Ingénieur au CEA de Grenoble, Directeur



Remerciements.

Je souhaite commencer les premières pages de cette thèse en remerciant le Professeur Marc Fontecave, directeur du Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux (LCBM) ainsi que le professeur Stéphane Ménage qui lui a succédé lors de ma dernière année de thèse.

Le LCBM m'a donné l'occasion de rencontrer des personnes exceptionnelles qui m'ont considérablement apporté et permis d'utiliser de nombreuses techniques dans une ambiance studieuse et amicale. La qualité du laboratoire est de rassembler ces deux aspects qui sont, je le pense, indispensables à la recherche.

Je tiens particulièrement à vous remercier pour le temps que vous avez consacré à répondre à mes multiples interrogations en matière de chimie et de physique (le plus souvent des Fe-S mais pas seulement) mais aussi pour votre aide dans ma recherche de postdoc.

Concernant le sujet de ma thèse, je souhaite remercier le Dr. Mohamed Atta qui m'a formé à la recherche et soutenu pour obtenir une bourse de la région Rhône-Alpes. Merci Hamid de m'avoir fait travailler sur ce sujet et ainsi d'avoir su me faire partager cette grande aventure sur l'étude des thiométhyltransférases que tu avais commencée en 2000 au cours de la thèse du Dr. Fabien Pierrel. Je veux également te remercier pour ton soutien lors de la publication de nos résultats avec, à deux reprises, une concurrence internationale directe. Merci aussi de m'avoir accordé ta confiance en me laissant une grande liberté dans l'exécution des expériences que je voulais réaliser pour tester certaines de mes hypothèses. C'est l'une des choses les plus importantes d'une thèse que de pouvoir concevoir puis tester expérimentalement ses propres hypothèses (...afin d'en voir tous les défauts mais heureusement parfois aussi les qualités !). Enfin, merci de m'avoir permis, dès la fin de ma première année, de présenter mes résultats en congrès et d'avoir appuyé ma candidature pour une bourse de mobilité (Club Métalloprotéine) afin d'aller dans le laboratoire du Pr. John Hunt dans le but de tester la cristallisation des protéines RimO et MiaB.

Je tiens à remercier le Dr. Etienne Mulliez qui a travaillé sur MiaB. Etienne, j'ai beaucoup appris à tes côtés. Merci d'avoir été là, souvent tard le soir, pour parler bibliographie et expériences ainsi que pour ton aide si précieuse lorsque celles-ci ne se déroulaient pas comme prévu. Merci également pour ta disponibilité, ton sens du partage et ta motivation sans

faillie à trouver quelles seront les prochaines expériences à réaliser parfois avant même que les « manips » en cours ne soient finies!

Je suis heureux que l'on ait pu avancer dans la compréhension du mécanisme des thiométhyltransférases, fruit de nombreuses discussions avec Marc et Hamid pendant lesquelles nous avons pu confronter les différents arguments scientifiques afin d'arriver à notre objectif. Je garderai en moi cette force motrice qui me permettra de cheminer dans la recherche avec l'idée que la patience, la persévérance et la rigueur scientifique mènent à la compréhension de certains mécanismes enzymatiques. Merci encore, Etienne, pour mon éveil à la chimie et pour ta patience lors de la synthèse du $\text{CH}_3\text{Se}^{77}$ (ou du CH_3S) dont les propriétés olfactives ne s'oublient pas!

Enfin, Etienne et Hamid, je tiens à vous remercier pour les multiples re-lectures et conseils que vous m'avez donnés lors de la rédaction de ce manuscrit avec pour mot d'ordre la transmission d'un message compréhensible.

Je souhaite remercier aussi les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse et d'être venus à Grenoble, parfois de loin, pour juger m'a soutenance de thèse afin que ce jour reste une journée particulière.

Je tiens à remercier particulièrement les personnes sans qui je n'aurais pu présenter ces résultats :

Les Drs. Serge Gambarelli et Jean-Marie Mouesca pour les expériences ainsi que l'analyse théorique des spectres HYSCORE. Merci pour vos explications précieuses sur ces techniques très utiles à l'étude de la biochimie des centres Fe-S qui requièrent de solides bases en physique nécessaires pour comprendre les subtilités des quadrants (+ , +) et (- , +).

Les Dr. Thierry Douki et Sylvie Kieffer-Jaquinod pour leur aide indispensable à la spectrométrie de masse.

Le Pr. John Hunt et le Dr. Farhad Forouhar pour mes premiers pas dans le monde de la cristallographie des protéines où il est parfois difficile de comprendre pourquoi, d'un cristal à un autre, il est possible de passer de 7 angström à 3 angström!

Les Drs. Jean-Marc Latour, Geneviève Blondin, Martin Clemancey et Ricardo Garcia-Serre de l'équipe Physicochimie des Métaux en Biologie du LCBM pour la caractérisation de l' holo-RimO.

Une attention spéciale pour le Dr. Sandrine Ollagnier de Choudens pour nos nombreuses discussions scientifiques... mais aussi sportives en particulier sur l'univers montagnard. La possibilité de parler montagne avec toi au laboratoire, c'est un peu comme faire une randonnée pendant quelques minutes, le temps que le gel décolore ou que la PCR se termine!

Je souhaite également remercier toutes les personnes qui m'ont aidé à préparer ma soutenance de thèse. Merci pour vos conseils et vos remarques que j'ai, dans la mesure du possible, essayé de suivre.

Pour finir, je souhaite remercier ma famille et mes amis qui m'ont soutenu et souvent attendu avec patience lorsqu'une « manip » durait un peu plus longtemps que prévu pour cause « d'organisation foireuse ». Désolé aussi pour ma « non-joignabilité » au téléphone. Je vous l'avoue, je réponds rarement au téléphone et ce d'autant plus quand je suis au labo ! Mais vous avez certainement dû vous en rendre compte !

Merci à mes parents, ma sœur et mon frère jumeau de m'avoir écouté, parfois sans trop comprendre, lorsque je vous racontais ma semaine. Enfin, merci Emilia pour ta compagnie, ton amour, ton aide au quotidien, ta patience et ta confiance dans le fait que l'on puisse partir travailler et découvrir ensemble de nouvelles contrées lointaines.

*Je ne connais pas la moitié d'entre vous
à moitié autant que je voudrais ;*

*et j'aime moins que la moitié d'entre vous
à moitié aussi bien que vous le méritez.*

Les seigneurs des anneaux, J.R.R Tolkien

Sommaire.

SOMMAIRE.....	7
ABREVIATIONS.....	11
INTRODUCTION GENERALE.	13
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.	15
I) IMPORTANCE DU SOUFRE EN BIOLOGIE.	15
I-1) <i>Le soufre</i>	15
I-2) <i>Le soufre, un élément essentiel</i>	16
I-3) <i>Le métabolisme du soufre</i>	17
II) LES METABOLITES SOUFRES.	20
II-1) <i>Les centres [Fe-S]</i>	20
II-2) <i>Insertion de soufre par voie ionique</i>	26
II-2-1) Les relais de soufre par persulfuration de cystéine.	27
II-2-2) l'exemple de (S,S)-Adénosylméthionine (SAM).	27
II-3) <i>Insertion de soufre par voie radicalaire</i>	29
II-3-1) Le radical 5'-désoxyadénosyle.	30
II-3-2) Les enzymes Radical-SAM : l'exemple de MoaA.	32
II-3-3) Les enzymes Radical-SAM et l'insertion radicalaire de soufre.	34
II-3-3-1) La Biotine synthase (BioB).	35
II-3-3-1-1) Généralités.	35
II-3-3-1-2) Nature des centres [Fe-S].	35
II-3-3-1-3) Mécanisme de la biotine synthase : la nature du soufre inséré.	37
II-3-3-2) La lipoate synthase (LipA).	40
II-3-3-3) La méthylthiotransférase MiaB.	41
II-3-3-4) La méthylthiotransférase RimO.	43
II-3-3-5) Autres nucléosides thiométhylés.	44
III) DEFINITION DU PROJET.	46
III-1) <i>Etude de la méthylthiotransférase RimO (Chapitre I)</i>	46
III-2) <i>Etude du mécanisme de MiaB et RimO (Chapitre II)</i>	47
III-3) <i>Etude bioinformatique des méthylthiotransférases et découverte des classes fonctionnelles MtaB et e-MtaB (Chapitre III)</i>	47
MATERIELS ET METHODES.	49
I) MATERIEL BIOLOGIQUE A DISPOSITION AU LABORATOIRE.	49
I-1) <i>ADN génomique</i>	49
I-2) <i>Souches bactériennes utilisées</i>	49
I-2-1) <i>E. coli</i> DH5 α	49
I-2-2) <i>E. coli</i> BL21(DE3).	49
I-2-3) <i>E. coli</i> BL21 Codonplus® (DE3)-RIL.	50
I-2-4) <i>E. coli</i> MiaB ⁻ (TX3346).	50
I-2-5) <i>B. subtilis</i> (MGNA-A001) : souche sauvage de <i>B. subtilis</i>	50
I-2-6) <i>B. subtilis</i> yqeV ⁻ (souche MGNA-C496).	50
I-3) <i>Les plasmides</i>	50
I-3-1) RimO-Tm-pET3b.	50
I-3-2) RimO-Tm-pET21d.	51
I-3-3) MiaB-Tm-pT7-7.	51
I-3-4) Cdkal1-Mm-pGEX6P1.	51
I-4) <i>Milieu de culture</i>	51
II) BIOLOGIE MOLECULAIRE.	52
II-1) <i>Cellules compétentes et transformation</i>	52
II-2) <i>Amorces PCR pour amplification de gène à partir d'ADN génomique</i>	52
II-3) <i>Amorces PCR pour l'insertion d'une ou plusieurs mutations par mutagenèse dirigée</i>	53
II-4) <i>Clonages</i>	55
II-4-1) Ligation.	55
II-4-2) Clonage indépendant de la ligation (LIC) et électroporation.	55
II-4-3) Extraction, purification et solutions de plasmides.	56
III) METHODES BIOCHIMIQUES.	56
III-1) <i>Expression des enzymes</i>	56
III-1-1) Surexpression des protéines thermophiles.	57

III-1-2) Expression de MtaB-Bs.	57
III-2) Production des substrats des enzymes étudiées.	57
III-2-1) Substrat de l'enzyme RimO.	58
III-2-2) Substrat de MiaB : l'ARNt ^{Phe}	58
III-3) Purification des protéines.	58
III-3-1) Nomenclature des protéines surexprimées.	58
III-3-2) Préparation des extraits protéiques.	59
III-3-3) Colonne hydrophobe Butyl-Sépharose.	59
III-3-4) Colonne Ni-NTA.	60
III-3-5) Colonne d'affinité Bleu-Sépharose.	60
III-4) Préparation des apoprotéines.	61
III-5) Reconstitution des centres [4Fe-4S] en boîte à gants.	61
III-5-1) Reconstitution des centres [Fe-S].	61
III-5-2) Reconstitution des centres [Fe-S] pour analyse par spectroscopie Mössbauer.	62
III-5-3) Amélioration des préparations protéiques.	62
III-6) Réduction des centres [Fe-S].	62
III-7) Détermination de la concentration.	63
III-8) Dosage du Fer.	63
III-9) Dosage du soufre.	64
III-10) Dosage du soufre S ⁰	64
III-11) Extraction et purification des ARN de transfert.	65
III-11-1) Extraction des ARNt.	65
III-11-2) Purification des ARN de transferts sur colonne Nucleobond.	65
III-11-3) Purification de l'ARNt ^{Phe}	66
III-12) Test d'activité de l'holoenzyme RimO.	66
III-12-1) Conditions expérimentales.	66
III-12-2) Analyse par spectrométrie de masse des peptides produits.	67
III-12-3) Analyse HPLC des sous-produits de la réaction sur colonne C18.	67
III-12-4) Analyse HPLC des produits et sous-produit de la réaction sur colonne C3.	68
III-13) Test d'activité de l'holoenzyme MiaB.	68
III-14) Analyse des ARNt par HPLC.	69
III-14-1) Digestion des ARN de transferts.	69
III-14-2) Analyse HPLC des nucléosides modifiés.	69
IV) METHODES BIOPHYSIQUES.	70
IV-1) Techniques spectroscopiques.	70
IV-2) Spectroscopie HYSORE.	71
IV-2-1) Principe.	71
IV-2-2) Détection d'un couplage fort entre un centre [4Fe-4S] et la S-adénosylméthionine (SAM).	72
IV-3) Cristallographie aux rayons X des thiométhyltransférases.	73
RESULTATS.	75
I) CARACTERISATION BIOCHIMIQUE, SPECTROSCOPIQUE, FONCTIONNELLE ET STRUCTURALE DE LA THIOMETHYLTRANSFERASE RIMO.	75
I-1) Analyse bioinformatique de la MTTase RimO.	76
I-2) Obtention de la thiométhyltransférase RimO de <i>T. maritima</i>	78
I-2-1) Surexpression de RimO de <i>T. maritima</i> dans la souche <i>E. coli</i> BL21 Codonplus® (DE3)-RIL.	78
I-2-2) Purification de l'enzyme RimO de <i>T. maritima</i>	79
I-2-2-1) Colonne Butyl-Sépharose.	79
I-2-2-2) Gel SDS-PAGE 12% après Butyl-Sépharose.	80
I-2-2-3) Profil d'élution FPLC de l'apo-RimO sur colonne Superdex75.	81
I-3) Obtention de la thiométhyltransférase RimO-6H de <i>T. maritima</i>	82
I-3-1) Surexpression de la protéine RimO-6H de <i>T. maritima</i>	82
I-3-2) Préparation de la protéine RimO-6H de <i>T. maritima</i>	83
I-4) Etude biochimique de RimO.	83
I-4-1) Reconstitution des centres [Fe-S] de la protéine RimO.	83
I-4-2) Cinétique de reconstitution suivie par spectroscopie UV-Visible.	84
I-4-3) Détermination des coefficients d'extinction molaire de l'apo et de l'holo-RimO.	84
I-4-4) Dosage du fer et du soufre présent dans l'holo-RimO.	85
I-5) Caractérisation spectroscopique.	85
I-5-1) Spectroscopie UV-Visible de l'holo-RimO.	86
I-5-2) Spectroscopie RPE.	87
I-5-2-1) Conditions d'enregistrement des spectres.	87
I-5-2-2) Spectre RPE de RimO à champ fort.	87
I-5-2-3) Spectre RPE de RimO à champ faible.	89

I-5-2-4) Spectre RPE de RimO en présence de SAM.	89
I-5-3) Spectroscopie Mössbauer.	90
I-5-3-1) Spectre Mössbauer de RimO.	90
I-5-3-2) Spectre Mössbauer de RimO en présence de SAM.	92
I-5-3-3) Spectre Mössbauer de RimO en conditions réductrices.	94
I-5-3-4) Spectre Mössbauer de RimO en conditions réductrices et en présence de SAM.	96
I-6) Test d'activité enzymatique de RimO.	97
I-6-1) Détection des produits de la réaction.	97
I-6-2) Détection des sous-produits de la réaction.	101
I-6-3) Cinétique de formation des sous-produits de la réaction.	102
I-7) Structure cristallographique de l'apo-RimO <i>T. maritima</i> .	103
I-8) Discussion.	110
II) ETUDE DU MECANISME REACTIONNEL DES MTTASES.	113
II-1) Activité catalytique de MiaB et RimO.	114
II-1-1) Etude préliminaire réalisée sur RimO.	114
II-1-1-1) Amélioration de la préparation de l'holo-RimO.	114
II-1-1-2) Structure tridimensionnelle de l'holo-RimO.	115
II-1-1-3) Activité de l'holo-RimO.	118
II-1-2) Etude du mécanisme réactionnel de MiaB.	120
II-1-2-1) Amélioration de la préparation de MiaB.	120
II-1-2-2) Le test d'activité de MiaB.	121
II-1-2-3) Activité catalytique de MiaB.	122
II-1-2-4) Activité de l'holo-MiaB en présence de sélénure.	123
II-1-2-5) Cinétique des produits et sous-produits de la réaction en présence de sélénure.	124
II-1-2-6) Spectroscopie RPE de MiaB en présence de sulfure.	125
II-2) Etude mécanistique.	127
II-2-1) Activité de MiaB en présence de CH ₃ SNa.	127
II-2-2) Activité de MiaB en présence de CH ₃ SeNa.	128
II-3) Etude spectroscopique HYSCORE de la protéine MiaB.	130
II-3-1) Spectroscopie HYSCORE de protéine MiaB-3M.	130
II-3-2) Spectroscopie HYSCORE de la protéine MiaB-3M-N13C.	132
II-3-3) Spectroscopie HYSCORE de l'holo-MiaB-3M en présence de sulfure.	133
II-3-4) Spectroscopie HYSCORE de la l'holo-MiaB-3M en présence de CH ₃ ⁷⁷ SeNa.	134
II-3-6) Spectroscopie RPE en bande X et HYSCORE de l'holo-MiaB en présence de SAM.	135
II-3-6-1) Spectroscopie RPE de l'holo-MiaB en présence de SAM.	135
II-3-6-2) Spectroscopie HYSCORE de l'holo-MiaB en présence de SAM et d'ARNt ^{Phe} .	136
II-4) Méthylation en absence de substrat.	137
II-5) Discussion.	138
II-6) Hypothèses mécanistiques.	140
II-6-1) Mécanisme proposé pour RimO.	140
II-6-2) Mécanismes proposés pour MiaB.	142
II-7) Perspectives.	144
III) ETUDE PHYLOGENETIQUE DES MTTASES.	145
III-1) Alignements de séquences de MTTases.	145
III-2) Analyse bioinformatique des MTTases.	148
III-3) Expression des MTTases <i>YqeV</i> de <i>B. subtilis</i> et <i>Cdkal1</i> de <i>M. musculus</i> dans <i>E. coli</i> TX3346.	150
III-3-1) Le choix de la souche <i>E. coli</i> MiaB ⁻ (TX3346).	150
III-3-2) Analyse HPLC et spectrométrie de Masse.	150
III-4) Complémentation <i>in vivo</i> d'une souche de <i>B. subtilis</i> MGNA-C496 (<i>yqeV</i> ⁻).	152
III-5) Une nouvelle nomenclature pour les familles de MTTases, <i>YqeV</i> et <i>Cdkal1</i> .	154
III-5-1) Surexpression de MtaB de <i>B. subtilis</i> et <i>Cdkal1</i> de souris dans la souche <i>E. Coli</i> BL21(DE3) RIL.	155
III-5-2) Purification de MtaB de <i>B. subtilis</i> .	156
III-5-3) Caractérisation spectroscopique par UV-visible et RPE de l'holo-MtaB.	157
III-5-4) Test enzymatique <i>in vitro</i> de MtaB et e-MtaB.	159
III-6) Discussion.	160
III-7) Perspectives.	164
III-7-1) Hypothèses sur la formation de hn ⁶ A et ms ² hn ⁶ A.	164
III-7-2) Analyse du génome de <i>T. maritima</i> , clonage des deux méthylases TM0182 et TM0884.	166
CONCLUSION GENERALE.	167
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.	171

Abréviations.

Å	Angström
mT	millitesla
GHz	Gigahertz
ppm	Partie par million
ϵ	Coefficient d'extinction molaire
DO	Densité optique
AE	Activating Enzyme (Enzyme Activatrice)
RimO	<u>R</u> ibosomale <u>m</u> odification <u>O</u>
ms-D89-S12	méthylthio asparatate 89 de la protéine ribosomale S12
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
ARNt-A37	Adénosine 37 des acides ribonucléiques de transfert
MiaB	<u>M</u> ethylthio <u>i</u> sopentenyl <u>a</u> denosine <u>B</u>
i ⁶ A-37	N <u>6</u> -isopentenyladénosine <u>37</u>
ms ² i ⁶ A-37	<u>2</u> - <u>m</u> éthylthio-N <u>6</u> -isopentenyladénosine <u>37</u>
MtaB	<u>M</u> ethylthio <u>t</u> hréonylcarbamoyladénosine <u>B</u>
t ⁶ A-37	N <u>6</u> -thréonylcarbamoyladénosine <u>37</u>
ms ² t ⁶ A-37	<u>2</u> - <u>m</u> éthylthio-N <u>6</u> -thréonylcarbamoyladénosine <u>37</u>
SAM	S-adénosylméthionine
Ado [•]	radical 5'-désoxyadénosyle
AdoH	5'-désoxyadénosine
Radical-SAM	Enzyme avec un centre [4Fe-4S] produisant Ado [•] à partir de la SAM
ORF	<u>O</u> pen <u>r</u> eadin <u>g</u> <u>f</u> ram <u>e</u> (cadre de lecture)
PCR	<u>R</u> éaction de polymérisation en <u>ç</u> haîne
PLP	Phosphate de pyridoxal
S	Etat de spin
RPE	<u>R</u> ésonance paramagnétique <u>é</u> lectronique
HYSCORE	2D <u>h</u> yperfine <u>s</u> ub-level <u>c</u> orrelat <u>ion</u>
ENDOR	<u>D</u> ouble <u>r</u> ésonance <u>é</u> lectronique <u>n</u> ucléaire
ENH	Electrode normale à hydrogène
EDTA	<u>A</u> cide <u>é</u> tylène <u>d</u> iamine <u>t</u> étraacétique

DTT	Dithiothréitol
HPLC	High pressure liquid chromatography
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside
AS	Sulfate d'ammonium
SDS	Dodécyl sulfate de sodium
TFA	Acide trifluoroacétique
Tris	Tris-hydroxyméthyl-aminométhane
DMPD	N,N-diméthyl-p-phénylènediamine monochlorohydrate

Introduction générale.

Chez les procaryotes, après la transcription des gènes en ARN messager, la traduction est réalisée par le ribosome qui est un macrocomplexe constitué de deux sous-unités, elles-mêmes comprenant trois molécules d'ARN ribosomal (ARNr) (23 S et 5 S pour la grande sous-unité et 16 S pour la petite sous-unité) ainsi que des protéines ribosomales au nombre de 34 pour la grande sous-unité et de 21 pour la petite sous-unité. Ce macrocomplexe a une activité ribozyme et est universellement conservé dans les trois règnes du vivant (Bactéries, Archées et Eucaryotes). Chez les eucaryotes le ribosome est encore plus développé (+40%) avec, par exemple, 49 protéines ribosomales dans la grande sous-unité (1) (Fig i-I). Au cours des dix dernières années, les structures du ribosome de plusieurs organismes ont été obtenues par cristallographie aux rayons X. Les travaux réalisés sur le ribosome procaryote ont été distingués avec l'attribution du prix Nobel de chimie 2009 à Venki Ramakrishnan, Tom Steitz et Ada Yonath (2).

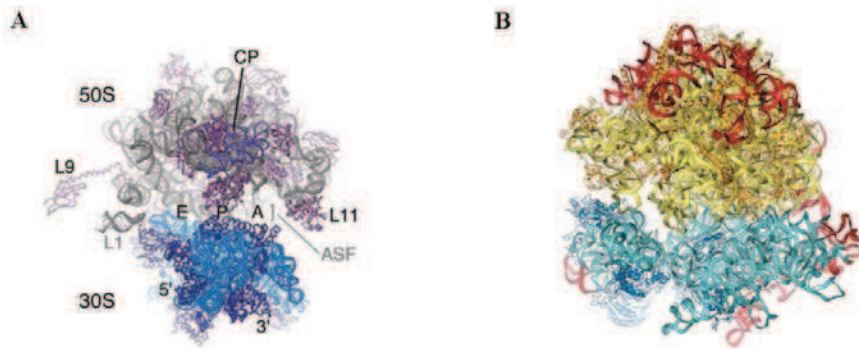


Figure i-I : Structure du ribosome procaryote d'*E. coli* (A) (reproduit de Schuwirth, *et al.* (3)) et eucaryote de *S. cerevisiae* (B) (reproduit de A. Ben-Shem *et al.* (1)).

La traduction comporte trois étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison. Au cours de ce processus le ribosome lit les triplets de nucléotides (codons) de l'ARN messager (ARNm) en les faisant correspondre à des anticodons présents dans les ARN de transferts (ARNt). Chaque ARNt utilisé par le ribosome possède un acide aminé en propre correspondant au codon de l'ARNm. L'activité ribozyme du ribosome permet de créer une liaison peptidique entre la chaîne peptidique en élongation et l'acide aminé porté par l'ARNt (4). Après translocation du ribosome, un nouveau cycle commence avec l'arrivée de l'ARNt suivant.

La traduction est un processus cellulaire extrêmement important pour les cellules et, de ce fait, finement régulé. Les molécules d'ARN ne sont formées qu'à partir de quatre nucléosides (Adénosine, Guanosine, Uridine et Cytidine) alors que les protéines sont constituées de 20 (+2) acides aminés universellement conservés. Ainsi, bien que la traduction fasse intervenir un très grand nombre de partenaires de nature et/ou structure très variées (ARNm, ARNt, ARNr, protéines ribosomales), ces macromolécules biologiques présentent des modifications (post-transcriptionnelles dans le cas des ARN et post-traductionnelles dans le cas des protéines) qui augmentent la diversité chimique de ces briques élémentaires du vivant. Ainsi, plus d'une centaine de ribonucléosides sont modifiés de façon post-transcriptionnelle (5). Dans le cas des modifications post-traductionnelles du ribosome d'*E. coli*, il a été rapporté des acétylations (protéines ribosomales S5, S18, L12), des méthylations (protéines ribosomales : S11, L3, L7/L12, L11, L16, L33) et une thiométhylation sur la protéine ribosomale S12. Certaines de ces modifications ont été conservées au cours de l'évolution alors que d'autres ne sont présentes que dans un ou deux des trois règnes du vivant.

Les voies biosynthétiques de ces modifications peuvent être classées en deux groupes. Dans le premier, ces modifications sont assurées par des enzymes utilisant une chimie ionique. Dans le deuxième groupe, ces modifications résultent d'une chimie radicalaire mise en œuvre par des enzymes produisant au cours de leur cycle catalytique des radicaux extrêmement réactifs capables d'activer des liaisons C-H très peu réactives.

Comme nous allons le voir, certaines de ces modifications contiennent des atomes de soufre qui sont insérés soit par un mécanisme ionique soit par un mécanisme radicalaire. Alors que les mécanismes d'insertion de soufre par voie ionique est relativement bien connu, les mécanismes d'insertion de soufre par voie radicalaire restent très mal compris.

Le travail présenté dans cette thèse concerne l'étude des mécanismes d'insertion radicalaire de soufre utilisés par les deux méthylthiotransférases RimO et MiaB. La compréhension de ces mécanismes est particulièrement importante tant au niveau fondamental qu'appliqué puisque ces biomolécules soufrées ont de multiples intérêts, tant pharmacologiques que biotechnologiques. De plus, certaines de ces modifications post-transcriptionnelles ont des connexions avérées avec des pathologies humaines graves telles que le diabète ou le cancer. Dans ce contexte, une meilleure compréhension de la biosynthèse de ces modifications pourrait avoir des retombées importantes dans le domaine de la santé.

Introduction bibliographique.

I) Importance du soufre en biologie.

I-1) Le soufre.

Les bases chimiques de la vie telle que nous la connaissons reposent sur l'utilisation préférentielle d'éléments parmi les plus abondants sur terre (H, C, N, O, P, S). Ces éléments au cœur desquels figure le carbone définissent une chimie dite « organique ». Cependant, la vie ne pourrait exister sans l'aide de catalyseurs. Ces biocatalyseurs du vivant qui sont, soit constitués d'acides aminés dans le cas des enzymes, soit constitués de nucléotides dans le cas des ribozymes, catalysent des milliers de réactions chimiques de nature très diverse. Un grand nombre de ces systèmes catalytiques nécessite, au sein de leurs sites actifs, des éléments traces tels que le Sélénium et plus souvent des cofacteurs inorganiques faisant intervenir des métaux de la première rangée des métaux de transition de la classification de Mendeleïev (Fe^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} ...) ou des métaux alcalino-terreux (Mg^{2+} , Ca^{2+} ...). Ces ions peuvent avoir différents rôles, soit purement structurant soit intervenir directement dans la réaction catalytique. Comme nous le verrons, il existe de nombreuses combinaisons et associations différentes de ces ions métalliques permettant aux enzymes de fonctionner de manière catalytique. Ces structures une fois caractérisées sont une source d'inspiration pour les chimistes pouvant conduire à l'élaboration de nouveaux catalyseurs.

Un des atomes essentiels à la vie est le Soufre. Cet atome fait partie de la famille des chalcogènes (O, S, Se, Te) possédant une structure électronique $ns^2 np^4$ ou $ns^2 (n-1)d^{10} np^4$ qui, avec deux doublets non-liants, lui permet de s'associer à différents atomes pour former des composés (in)organiques différents, par exemple avec lui-même (S, S_2 , S_3 , S_n ...), avec le carbone (CS_2 , CH_3S ...), d'autres hétéroatomes (SO_2 , SO_3 ...) ou encore avec des ions métalliques (NiS , FeS ...). Le soufre et l'oxygène étant tous deux des chalcogènes possèdent des propriétés chimiques comparables mais des réactivités sensiblement différentes. Par exemple les thiols sont de meilleures nucléophiles que les alcools. Au sein des protéines, les ponts disulfure (RS-SR) ont probablement été sélectionnés au cours de l'évolution parce qu'ils sont plus stables que les peroxydes (RO-OR). Ceci montre bien que les systèmes biologiques ont optés pour les liaisons chimiques les plus performantes. Le soufre est moins électro-négatif que l'oxygène et possède un domaine d'état d'oxydation plus large que

l'oxygène. Ceci peut être illustré par la cystéine dont les degrés d'oxydation vont de -1 (cystéinate) à +5 (acide sulfonique, $\text{R-SO}_3\text{H}$) en passant par +1 (acide sulfénique, R-SOH) et +3 (acide sulfinique, $\text{R-SO}_2\text{H}$).

I-2) Le soufre, un élément essentiel.

Dans le métabolisme cellulaire, le soufre participe en tant qu'acide aminé constitutif des protéines (méthionine, cystéine), dans certaines modifications post-transcriptionnelles notamment dans les ARNt, et en tant que cofacteur. Il est également présent dans certains partenaires métaboliques tels que les sucres, les antibiotiques (les pénicillines) ou les lantibiotiques (caractérisés par leurs ponts thioether). Bien que nombre de ces composés soufrés soient connus depuis de nombreuses années, leurs biosynthèses restent encore mal comprises (6). Dans ce contexte, l'étude des mécanismes enzymatiques d'insertion de soufre en biologie est aujourd'hui un sujet de recherche fondamentale en pleine expansion étant donné le potentiel industriel (en chimie et en biotechnologie) que représentent ces biomolécules soufrées (biotine, lipoate, coenzyme A...).

Le métabolisme cellulaire nécessite relativement peu de molécules soufrées qui sont cependant essentielles (6). Le fait que ces molécules soufrées soient présentes à des étapes clés de ce métabolisme laisse penser que la vie a utilisé le soufre très tôt. Sans revenir sur les différentes théories sur l'origine de la vie (7-10), il semble que le soufre ait joué un rôle essentiel impliquant notamment la pyrite (FeS_2) comme support et catalyseur primordial pour des réactions de transfert d'électron et d'activation de petites molécules. Pour ne citer qu'un seul exemple, le complexe de la pyruvate déshydrogénase qui permet de relier la glycolyse au cycle de Krebs est un exemple particulièrement frappant puisque pas moins de trois biomolécules soufrées sont nécessaires pour transférer une partie du pyruvate au coenzyme A. La première est la thiamine fixée à une des lysines de la pyruvate déshydrogénase (réaction A) et qui intervient dans la décarboxylation du pyruvate. La deuxième est le lipoate présent dans la dihydrolipoyl transacetylase (réaction B) nécessaire pour le transfert du groupement acétyle sur le coenzyme A. Enfin, le coenzyme A récupère le groupement acétyle sur le lipoate permettant la formation d'acétyl coenzyme A (Réaction C). Le coenzyme A est une biomolécule soufrée indispensable au bon fonctionnement du cycle de Krebs (Fig I-2). Le lipoate, oxydé à la fin de la réaction, est réduit par une molécule de FAD.

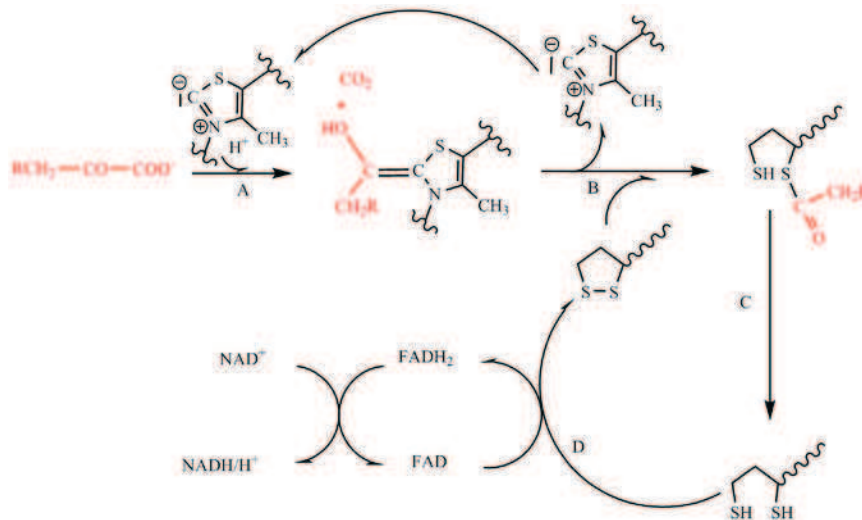


Figure I-2 : Mécanisme du complexe de la pyruvate déshydrogénase.

Cet exemple d'une étape clé du métabolisme cellulaire montre l'importance de ces biomolécules soufrées. Bien que leurs rôles au sein de ces enzymes soient connus maintenant depuis longtemps, la façon dont le soufre a été inséré au cours de leur biosynthèse reste un sujet d'étude majeur.

I-3) Le métabolisme du soufre.

Le métabolisme du soufre des procaryotes est complexe et implique de nombreuses biomolécules. En milieu aérobie, l'incorporation du soufre entraîne une consommation d'énergie. L'entrée du sulfate (SO_4^{2-}) dans la cellule n'est pas favorable puisque le milieu intracellulaire possède un potentiel fortement négatif (-70 mV) ce qui implique la réduction de ce soufre très oxydé (7). Chez *E. coli*, les gènes impliqués dans ces différentes étapes de réduction du soufre sont regroupés sous forme d'opérons (7). Les gènes *cysDNC* codent respectivement pour la 2^{ème} sous unité de la sulfate adényltransferase, la 1^{er} sous unité de l'ATP sulfurylase (ATP:sulfate adényltransferase) et l'adénylsulfate kinase (8). Les gènes *cysZ* et *cysK* ne seraient pas co-transcrits bien qu'étant proches voisins. Alors que CysZ est une protéine membranaire de fonction inconnue, CysK est une O-acetylserine sulfhydrylase proche phylogénétiquement de la tryptophane synthase (8). Les autres gènes de l'opéron, *cysPUWAN*, codent pour des protéines impliquées dans la fixation du thiosulfate et du sulfate périplasmique, une perméase membranaire de type ABC et une O-acetylserine sulfhydrylase spécifique du thiosulfate. Enfin le gène *cysE* code pour la serine O-acetyltransferase qui est le point d'entrée du soufre dans la biosynthèse de la L-cystéine (7).

La concentration en sulfure (S^{2-}/HS^-) est variable et estimée entre 20 et 250 μM (6). La famille d'enzyme O-acétylsérine sulfhydrylases utilise comme substrat le sulfure et la O-acétyl sérine pour catalyser la production de L-cystéine chez les bactéries et les plantes (Fig I-3-A). Le K_m de ce type d'enzyme pour le sulfure varie selon les études entre 6 μM et 5,2 mM (<http://www.brenda-enzymes.org/>) mais une revue récente suggère un K_m d'environ 500 μM (6). Bien que toxique à haute concentration, le sulfure semble être toléré pour permettre la biosynthèse de la L-cystéine qui, elle-même, ne dépasserait pas une concentration de 100 à 200 μM (9).

La L-cystéine joue un rôle central dans le métabolisme du soufre comme le montre la Figure I-2A. Elle est le donneur primaire de soufre pour de nombreuses biomolécules soufrées dont les coenzymes A, M et B, l'ergothionéine, l'ovothiol A, le mycothiol, le glutathion, le trypanothion et la méthionine. La famille des antibiotiques de type pénicilline possède aussi du soufre provenant de la L-cystéine. La production de cystathionine est catalysée par cystathionine β synthase (CBS) à partir de cystéine et d'O-succinyl homosérine (10). La cystathionine est ensuite transformée en homocystéine par la cystathionine β lyase (CBL) libérant du pyruvate et de l'ammoniaque. La méthionine synthase (MetH) catalyse ensuite la production de méthionine en utilisant comme substrats une molécule d'homocystéine et une molécule de N^5 - méthyltétrahydrofolate (N^5 -methyl THF) (Fig I-3-A). Enfin, la S-adénosylméthionine (SAM) qui est synthétisée par la méthionine adénosyle transférase (MAT) à partir de méthionine et d'ATP, est une molécule soufrée particulièrement importante dans le métabolisme cellulaire et dont nous reparlerons au cours de cette introduction.

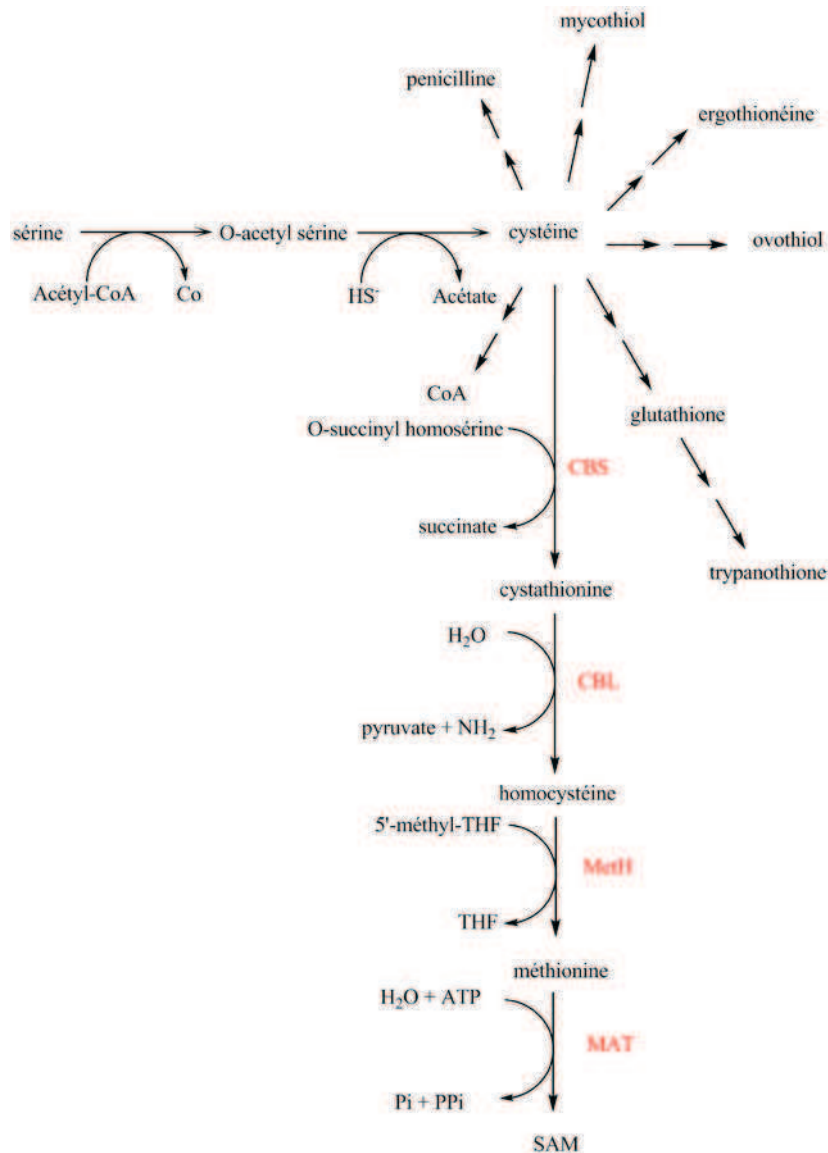


Figure I-3-A : Schéma simplifié du métabolisme de la cystéine (inspiré de Kessler (6)).

Comme nous l'avons dit précédemment, la L-cystéine est le donneur primaire de soufre et des enzymes appelées cystéine désulfurases permettent d'utiliser le soufre présent dans la L-cystéine. Ces enzymes utilisent le pyridoxal 5'-phosphate (PLP) comme cofacteur. La réaction catalysée conduit à la formation d'un persulfure sur une cystéine spécifique de l'enzyme et à la libération de L-Alanine (Fig I-3-B). Les cystéines désulfurases sont présentes dans la majorité des organismes procaryotes et eucaryotes. Elles apparaissent de plus en plus comme des acteurs centraux dans la biosynthèse des biomolécules soufrées (11).



Figure I-3-B: Schéma réactionnel des L-cystéines désulfurases.

Les cystéines lyases (aussi nommées L-cystéine désulfhydrases) sont d'autres enzymes PLP-dépendante qui permettent de mobiliser le soufre présent dans la L-cystéine. Ces enzymes catalysent la dégradation de la L-Cystéine entraînant la production d'ammoniaque, de pyruvate et de sulfure d'hydrogène (Fig I-3-C). Chez *E. coli* 5 enzymes appartenant à cette classe sont répertoriées : la O-acétylsérine sulfhydrylase-A, O-acétylsérine sulfhydrylase-B, la protéine MalY, la tryptophanase et cystathionine β -lyase (12).



Figure I-3-C : Schéma réactionnel des L-cystéines lyases.

Récemment, de nouveaux acteurs du métabolisme du soufre ont été découverts avec notamment H_2S comme modulateur de fonctions biologiques chez les eucaryotes (13). Les propriétés uniques du soufre laissent penser que le sulfure d'hydrogène est en équilibre permanent avec différentes formes de soufre à différents états d'oxydation (S^0 , S^{-1}) que sont les polysulfures (S_n) (18, 19).

II) Les métabolites soufrés.

II-1) Les centres [Fe-S].

Les centres [Fe-S] sont des cofacteurs enzymatiques versatiles et ubiquitaires chez tous les organismes vivants (14). Chez *E. coli* leur biosynthèse fait intervenir, selon les conditions de croissance cellulaire, une des trois machineries ISC, SUF ou CSD, dont les gènes sont organisés sous forme d'opéron (15). Les cystéines désulfurases IscS, SufS-SufE et CsdA codées par les gènes correspondants de ces opérons mobilisent le soufre de la cystéine sous forme de persulfure. Le soufre terminal de ce persulfure est ensuite transféré à différentes protéines « échafaudages » de centre [Fe-S] via l'intervention encore mal comprise de protéines annexes (fdx, et ygdK). Dans le cas de la machinerie ISC, ces protéines « échafaudages » sont représentées par IscU et IscA alors que dans la machinerie SUF, il s'agit des protéines SufA et SufBCD (22, 23). D'autres protéines sont requises pour

l'assemblage des centres [Fe-S] dont des régulateurs transcriptionnels comme la protéine IscR dans les machineries ISC et SUF.

L'identification de chacun des composants de ces machineries a été facilitée par leur organisation en opéron. Cependant, le rôle exact de chacune de ces protéines dans la biosynthèse des centres [Fe-S] reste encore un sujet de recherche en pleine effervescence. L'activité ATPase du complexe SufBC₂D montre que la biosynthèse de ces cofacteurs a un coût énergétique important pour les organismes (consommation d'ATP).

Les centres [Fe-S] les plus courants sont de trois types : [2Fe-2S], [3Fe-4S] et [4Fe-4S] (**Fig II-1-A**). Ces centres [Fe-S] dits « classiques » par opposition à des structures plus complexes (et plus rares) contiennent des atomes de fer de coordination tétraédrique et sont fixés à la protéine le plus souvent par des cystéines conservées dans des motifs relativement bien définis.

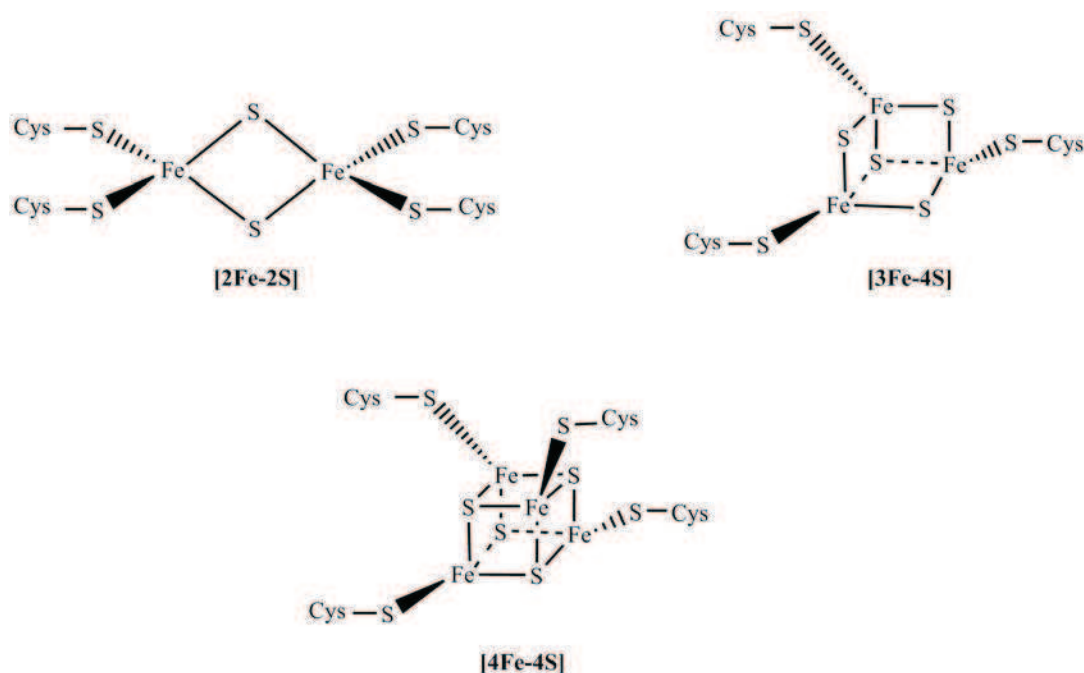


Figure II-1-A : Structure des centres [2Fe-2S], [3Fe-4S] et [4Fe-4S] canoniques.

Cependant, il existe des centres [Fe-S] possédant des ligands atypiques. Par exemple les hydrogénases et la 4-hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase contiennent un centre [4Fe-4S] coordonné par trois cystéines et un atome d'azote provenant d'une histidine (16-19). La structure cristallographique de la dihydropyrimidine déshydrogénase montre la présence d'un centre [4Fe-4S] coordonné par trois sulfures de cystéine et un oxygène de glutamine (28, 29). De

nombreuses protéines ne possèdent dans leurs séquences primaires que trois cystéines strictement conservées. Ces protéines sont potentiellement capables de fixer des centres [Fe-S] par ces cystéines, le dernier des quatre sites de coordination pouvant être occupé par un acide aminé, une petite molécule exogène, voire même une molécule d'eau.

Les centres [Fe-S] sont de nature très diverse et possèdent des propriétés structurales et spectroscopiques uniques (20). Ils sont majoritairement impliqués dans des transferts électroniques, notamment dans la chaîne respiratoire mitochondriale ou dans la photosynthèse chloroplastique. Un exemple récent est celui du complexe PsrABC permettant de réduire les polysulfures en H_2S chez *T. thermophilus*. Cette réductase est composée de trois protéines, dont PsrC capable de fixer au niveau du cytoplasme la ménaquinone-7 réduite. Les électrons de la ménaquinone sont relayés par 4 centres [4Fe-4S] présents dans PsrB jusqu'à un centre [4Fe-4S] présent dans PsrA et finalement au cofacteur bis-(molybdoptérine guanine dinucléotide) (bis-MGD) (Fig II-1-B) de cette enzyme et proposé pour réduire les espèces polysulfures en sulfure d'hydrogène (31).

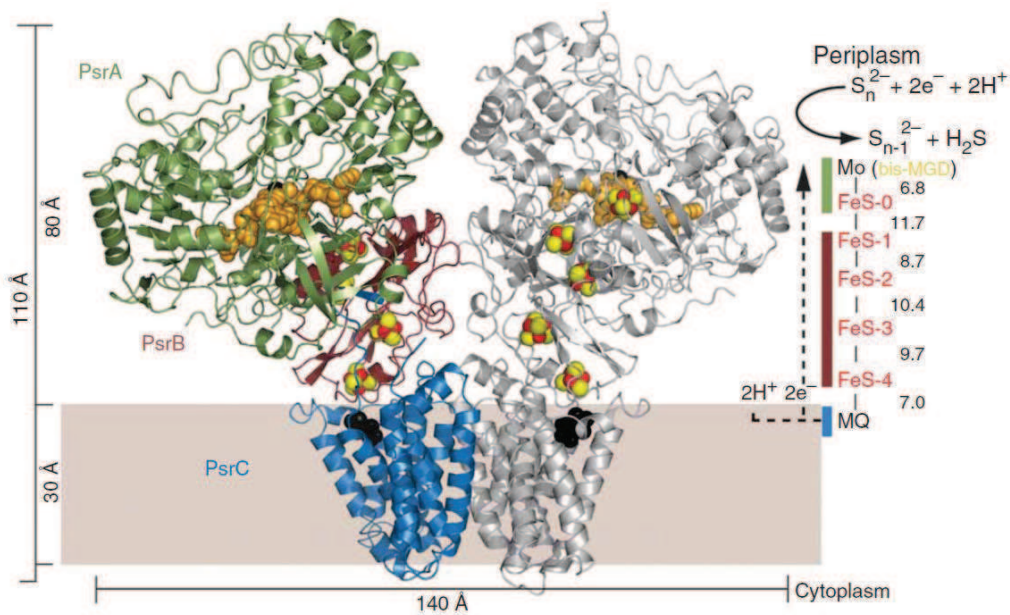


Figure II-1-B : Structure de la polysulfure réductase PsrABC de *T. thermophilus* à 2,4 Å de résolution. Sont représentés : les protéines PsrC (en bleu), PsrB (en marron) et PsrA (en vert) et les centres [4Fe-4S], le soufre en jaune et le fer en rouge. Le pentachlorophénol ou PCP (en noir) montre le site de fixation de la 7-ménaquinone dans PsrC. En orange, le cofacteur bis (molybdoptérine guanine dinucléotide) à molybdène (bis-MGD) dans PsrA. A droite, un schéma montre la trajectoire des électrons de la 7-ménaquinone (Reproduit de Jormakka *et al.*, (31)).

Cependant, les centres [Fe-S] possèdent de multiples autres fonctions comme : facteurs de transcription (FNR, IscR), senseurs (rédox ou non) de la quantité de fer ou d'oxygène (SoxR). Une autre fonction des centres [Fe-S] a été proposée dans le cas de l'endonucléase III. Cette enzyme reconnaît et coupe les nucléotides dont les bases sont endommagées. La structure de cette enzyme possédant un motif $CX_6CX_2CX_5C$ montre que ce centre [Fe-S] coordonné par ce motif intervient dans le positionnement des résidus basiques de la protéine en interaction avec les phosphates de l'ADN (32, 33). Une autre enzyme, RumA, est responsable de la méthylation de l'uridine 1939 en 5-méthyluridine dans l'ARN ribosomal 23S. Or RumA possède quatre cystéines (Cys81, Cys87, Cys90, Cys162) capable de fixer un centre [4Fe-4S] (21) qui participerait à la reconnaissance du substrat au niveau de l'uridine 1940 (22).

Cependant, les centres [Fe-S] peuvent aussi être directement impliqués dans des réactions de catalyse. L'un des exemples très bien connu est celui de l'aconitase qui catalyse l'isomérisation du citrate en isocitrate en ne faisant pas intervenir de réaction d'oxydoréduction. Cette enzyme possède un centre [4Fe-4S] dont trois des fers sont coordonnés par des cystéines. Le quatrième fer est labile et coordonné par une molécule d'eau qui est déplacée lors de la fixation du substrat (23).

Une autre fonction de centre [Fe-S] a été découverte chez certains organismes méthanogènes dont *Methanocaldococcus jannaschii* (24). L'absence de cystéine désulfurase dans cet organisme possédant de très nombreux centres [Fe-S] a attiré l'attention sur une nouvelle famille d'enzyme nommée L-cystéine désulfidase. Il a été proposé que ces enzymes possèdent un centre [4Fe-4S] capable de lier une cystéine libre sur son quatrième fer (Fig II-1-C). L'enzyme catalyse ensuite l'hydrolyse de la liaison C-S entraînant la production de pyruvate et d'ammoniaque (24).

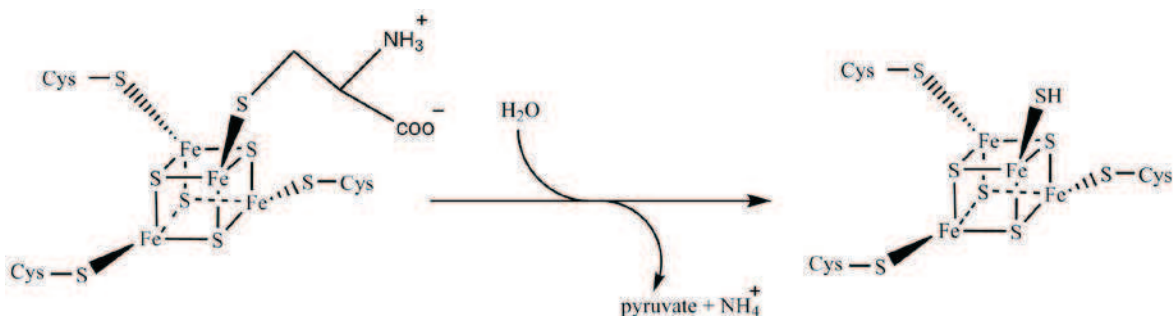


Figure II-1-C : Réaction de la L-cystéine désulfidase.

Récemment, une étude *in vivo* et bioinformatique a révélé l'existence d'un opéron nommé *cdsAB* (pour Cysteine Désulfidase A et B) présent dans de nombreuses bactéries anaérobies strictes et facultatives. Cet opéron est inductible par la L-cystéine et le gène *cdsB* existe chez *E. coli* sous le nom de *yham* (25).

D'autre part, il a aussi été rapporté que certaines archées méthanogènes possèdent une enzyme nommée hétérodisulfure réductase contenant un centre [4Fe-4S] impliqué dans la production de méthane. Cette enzyme catalyse la réduction réversible du disulfure coenzyme-M-coenzyme-B (CoM-S-S-CoB) en coenzyme-M (CoM-SH) et en coenzyme-B (CoB-SH). Le centre [4Fe-4S] serait directement impliqué dans la coordination du coenzyme-M (39, 40). Il a été proposé récemment que la réduction de CoM-S-S-CoB par l'hétérodisulfure réductase passe par deux étapes de réduction mono-électronique impliquant la formation intermédiaire d'un radical thiyl coordonné à un centre $[4Fe-4S]^{3+}$ possédant un fer pentacoordiné (41, 42).

Enfin, il faut citer le cas de la (R)-2-hydroxyisocaproyl-CoA déshydratase qui catalyse une étape cruciale et pratiquement irréversible du catabolisme fermentatif de la L-leucine. Cette enzyme est formée de deux sous unités α (HadB) et β (HdaC) et catalyse la formation du 2-isocaprenoyl-CoA par élimination d'une molécule d'eau (Fig II-1-D). Cette réaction thermodynamiquement défavorable nécessite la réduction du groupement carbonyle de la fonction thioester du substrat en un radical cétyle $R(CO^{\bullet})R$ par un électron provenant d'une enzyme activatrice ATP-dépendante.

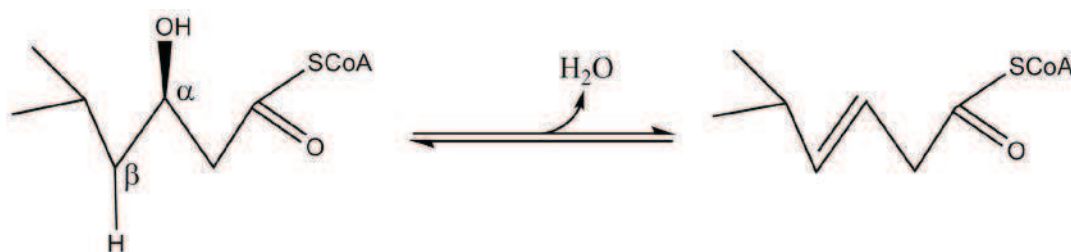


Figure II-1-D : Schéma réactionnel de la (R)-2-hydroxyisocaproyle-CoA déshydratase.

La structure de cette déshydratase a été résolue très récemment (26) et montre que chacune des sous unités α et β contient un centre [4Fe-4S] distant l'un de l'autre de 12 Å (Fig II-1-F). Le centre [Fe-S]- α est coordonné par trois cystéines alors que le quatrième fer est lié à la fonction hydroxyle du substrat (Fig II-1-F) en accord avec le mécanisme proposé par

Knauer *et al.* L'une des particularités de ce système est que 10 000 cycles catalytiques sont réalisés avant qu'une nouvelle activation ne soit nécessaire (27). Ceci signifie que l'électron responsable de l'activation du substrat en radical est réutilisé en permanence. La structure suggère que le centre [Fe-S]- β proche du centre [Fe-S]- α serve au recyclage de cet électron et montre que ce centre a une structure très particulière avec trois des quatre fer liés à trois cystéines de la protéine et le quatrième fer coordonné à un atome de soufre (ligand sulfhydryle/sulfido terminal) (Fig II-1-F).

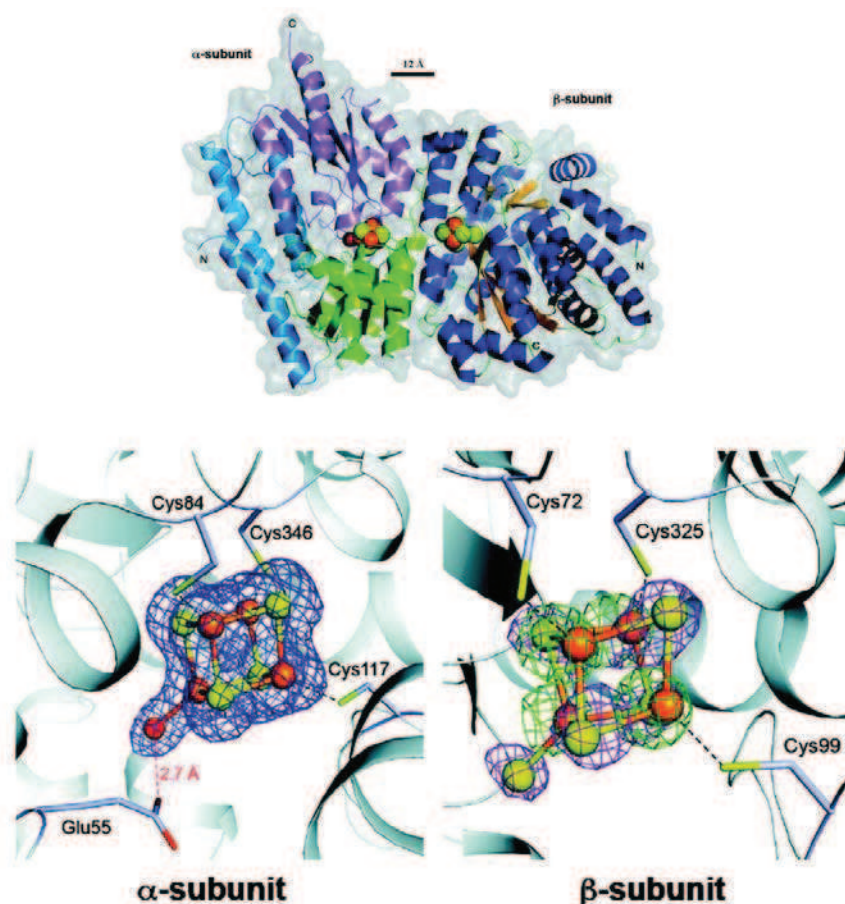


Figure II-1-F : Structure de la (R)-2-hydroxyisocaproyle-CoA déshydratase (Adaptée de Dobbek *et al.*, (26)).

La biosynthèse de métabolites thiolés procède principalement par deux mécanismes, ionique ou radicalaire que nous allons détailler.

Comme je l'ai déjà mentionné le donneur primaire de soufre dans la cellule est la L-cystéine. Le soufre de cette cystéine peut être transféré à une cystéine spécifique de cystéine désulfurases conduisant à la forme persulfurée de ces dernières. Sous cette forme, le soufre peut être ensuite distribué à différentes cibles par transpersulfuration.

II-2) Insertion de soufre par voie ionique.

De nombreuses molécules soufrées résultent de réactions d'insertion de soufre par mécanismes ioniques (28). La réaction la mieux étudiée sur le plan mécanistique est celle concernant la 4-thiouridine (s^4U) (29). La 4-thiouridine est présente en position 8 de certains ARNt bactériens. Des études *in vitro* ont montré que le produit du gène *thiI* est impliqué dans cette biosynthèse (47, 48). Le mécanisme de substitution de l'atome d'oxygène par le soufre est présenté en figure II-2. L'atome d'oxygène en position 4 est activé par ThiI par adénylation. En parallèle, la cystéine 456 du site actif de ThiI est persulfurée par IscS, la cystéine désulfurase de l'opéron ISC (30). Ce persulfure attaque, par substitution nucléophile, le carbone 4 de l'intermédiaire adénylé conduisant à l'insertion du soufre et la libération d'AMP. Le cycle réactionnel se termine par la formation d'un pont disulfure entre la cystéine 456 et la cystéine 344 qui doit être réduit pour le cycle catalytique suivant (Fig II-2).

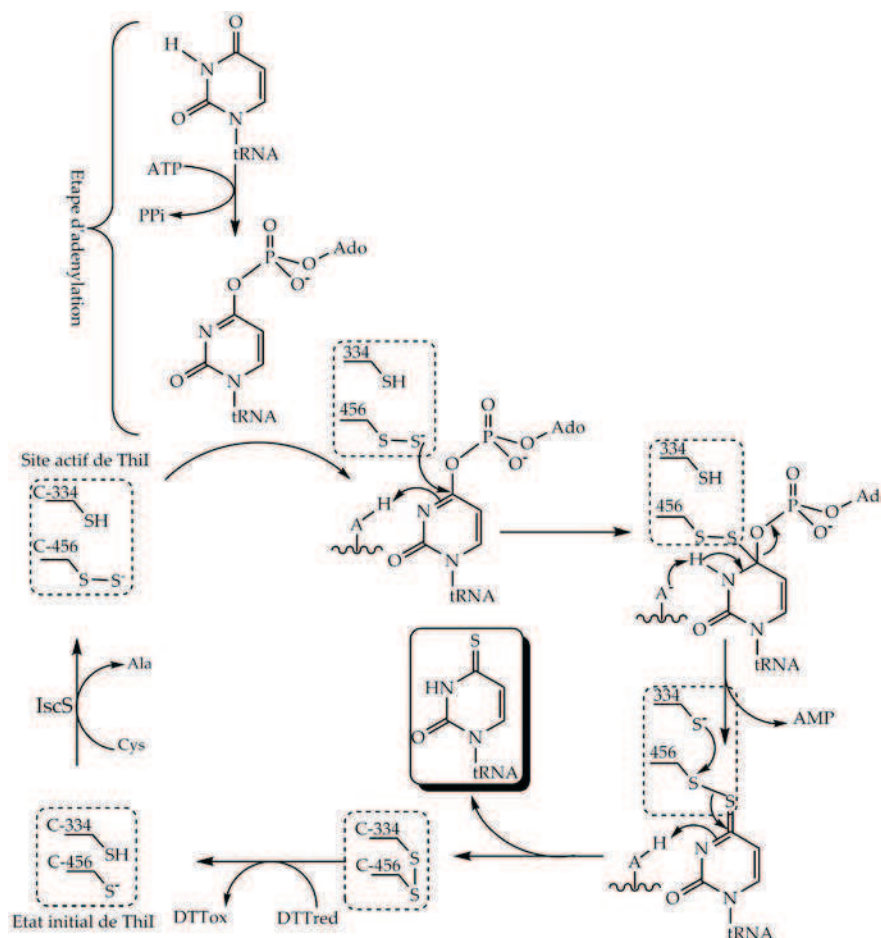


Figure II-2 : Mécanisme d'activation du substrat par adénylation de l'uridine 8 en position 4 puis insertion du soufre par substitution nucléophile.

II-2-1) Les relais de soufre par persulfuration de cystéine.

Ces relais enzymatiques permettent de délivrer le soufre de manière spécifique à l'enzyme MnmA. Cependant, d'autres partenaires enzymatiques pourraient aussi être persulfurés à partir de ce système qui permet d'augmenter le nombre de cibles sans perte de sélectivité. Ainsi, d'autres modifications post-transcriptionnelles pourraient être dépendantes de ce système Tus (Fig II-2-1).

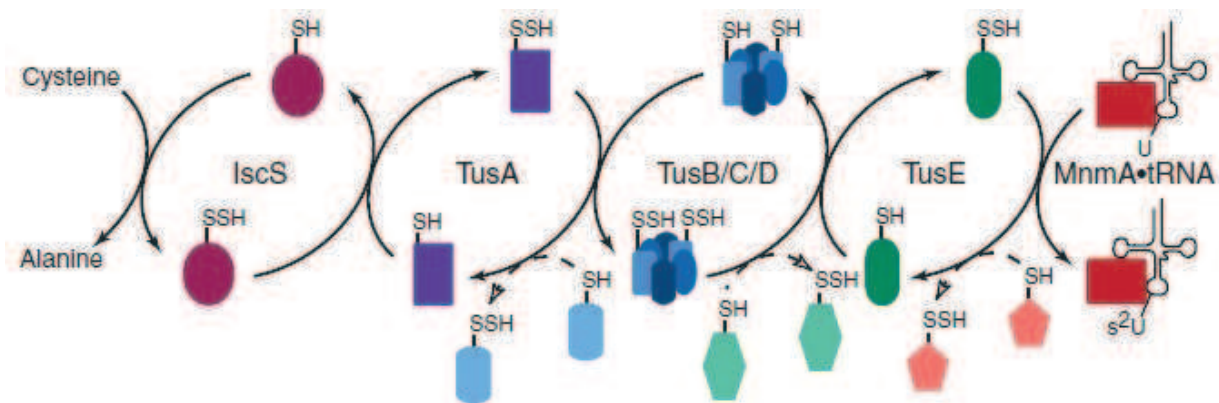


Figure II-2-1 : Cascade de transpersulfuration des protéines Tus (reproduit de Muller, (28)).

Ce relai enzymatique permet de délivrer le soufre de manière spécifique à l'enzyme MnmA. Cependant d'autres partenaires enzymatiques pourraient aussi être persulfurés à partir de ce système notamment via TusA, TusB/C/D ou TusE. Ce type de relais permet d'augmenter le nombre de nombre de cible sans perdre de sélectivité et d'autres modifications post-transcriptionnelles pourrait être dépendante de ce système Tus.

II-2-2) l'exemple de (S,S)-Adénosylméthionine (SAM).

La SAM est l'un des métabolites soufrés le plus abondant après l'ATP (31). C'est l'agent méthylant dans les systèmes biologiques (Fig II-2-2-A).

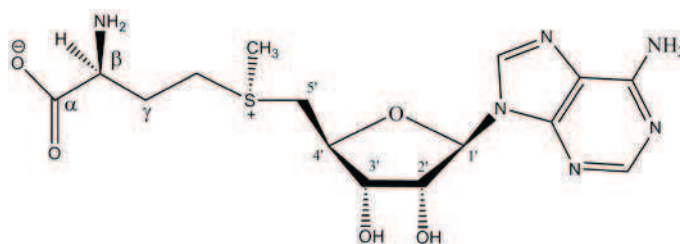


Figure II-2-2-A : Structure de la (S,S)-Adénosylméthionine.

La biosynthèse de la SAM est catalysée par la méthionine adénosyltransférase (Fig II-2-2-B) par réaction de condensation de la méthionine avec l'ATP et élimination de pyrophosphate et de phosphate. Cette enzyme catalyse la production du seul diastéréoisomère (S,S) qui peut se racémiser au cours du temps en isomère (R,S).

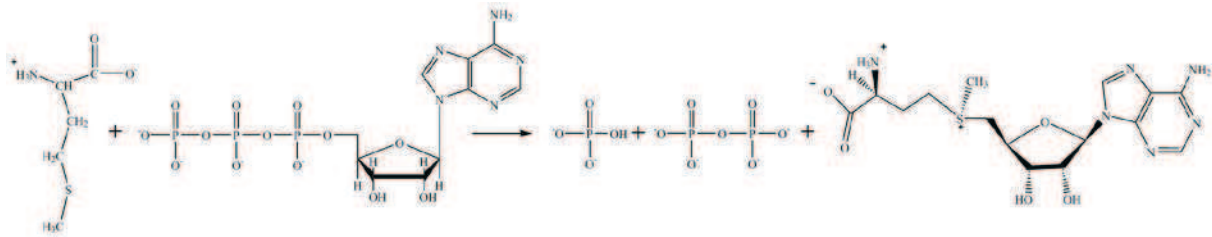


Figure II-2-2-B : Biosynthèse de la (S,S) SAM par la méthionine adénosyltransférase.

La SAM est utilisée dans un très grand nombre de réactions chimiques différentes et toutes les parties de celle-ci sont utilisées (32) (Figure II-2-2-C). Comme indiqué plus haut, la SAM est l'agent méthylant le plus utilisé dans les cellules (50, 52). Pour ne citer que quelques exemples, chez les bactéries, ces méthylations peuvent avoir lieu sur l'ADN en position 6 de l'adénine d'une séquence GATC par la méthylase Dam (DNA Adénine méthylase) ou sur la position 5 de la deuxième cytosine des séquences CCAGG et CCTGG par la méthylase Dcm (DNA Cytosine méthylase). Chez les mammifères, la méthylation de la cytosine en position 5 au niveau des îlots CpG entraîne la répression à long terme des gènes (53-55). La 5-méthylcytosine et la 5-hydroxyméthylcytosine sont parfois considérées comme les 5^{ème} et 6^{ème} base du génome (33). Les méthylations peuvent aussi avoir lieu sur des protéines (57) comme par exemple dans le cas des histones au niveau des résidus lysines et arginine. La SAM peut être utilisée comme précurseur de groupement méthylène dans la synthèse des acides gras cyclopropaniques (Fig (a)). L'amine du groupement α -aminocarboxylate peut servir de cosubstrat dans la biosynthèse de l'acide 7,8-diaminopélagronique (DAPA) (b). Dans la biosynthèse de la queuosine, c'est la partie ribose de la SAM qui est utilisée (c). Enfin, la partie α -aminocarboxypropionate (ACP) est utilisée lors de la biosynthèse de l'ACC (acide aminocyclopropane carboxylique) précurseur dans la biosynthèse de l'éthylène (d), de la N-acylhomoserine lactone, molécule clé du « quorum sensing » (e), de la acp³U (3-(3-Amino-3-CarboxyPropyl) Uridine) dans la modification des ARNt et la décarboxy-SAM dans la biosynthèse de la spermidine. Tous ces exemples montrent que la SAM est une molécule particulièrement importante et qui est utilisée de manière très efficace par différentes enzymes

utilisant des mécanismes ioniques sur une large gamme de substrats de natures très différentes.

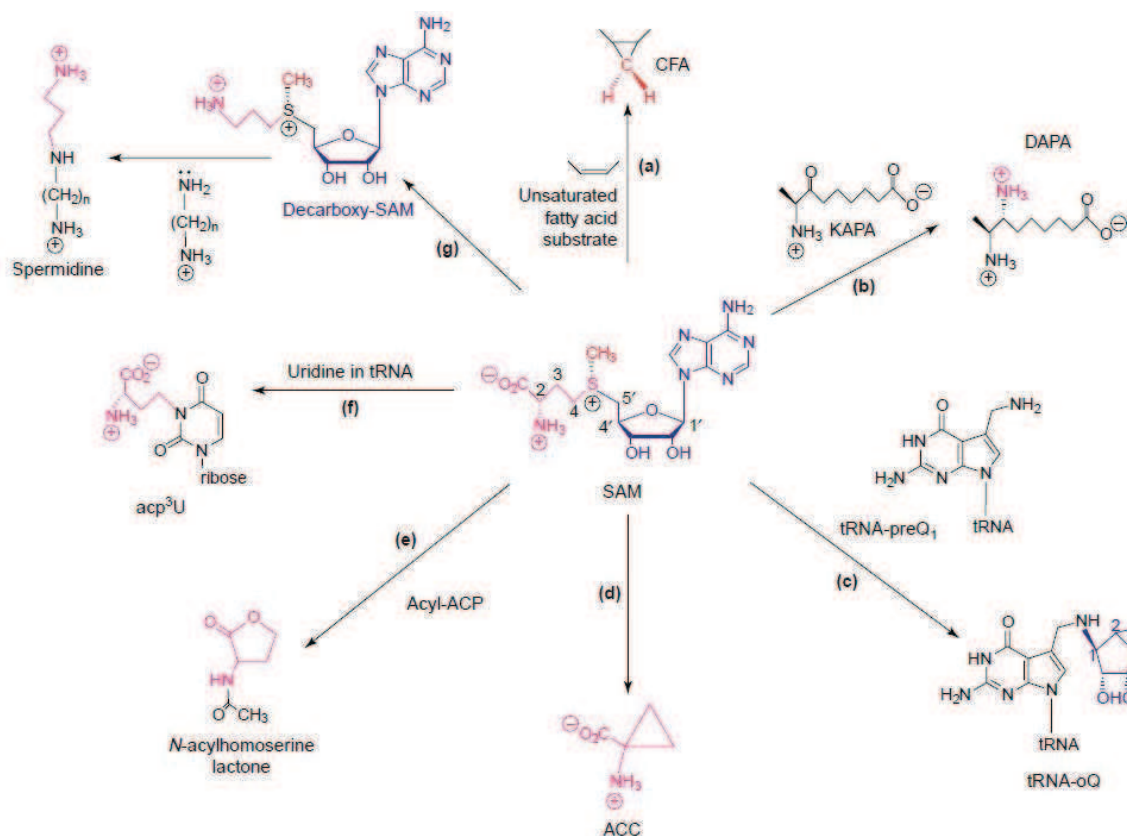


Figure II-2-2-C: La SAM, un métabolite dont chaque partie peut être utilisé (reproduit de Fontecave *et al*, (32)).

II-3) Insertion de soufre par voie radicalaire.

L'une des découvertes importantes des 20 dernières années est le fait que les systèmes biologiques sont capables de catalyser des réactions chimiques difficiles en utilisant, au sein du site actif de certaines enzymes, des radicaux. Cette découverte jette un éclairage complètement nouveau sur le rôle des radicaux en biologie qui étaient jusqu'alors principalement perçus comme toxiques du fait de leur très grande réactivité et leur propension à effectuer des réactions en chaîne (voir, par exemple, le rôle des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans le stress oxydant). D'un autre côté, le fait que les radicaux puissent être utilisés de façon positive par la cellule suppose un contrôle très strict de leur formation. Cet aspect est encore mal connu.

On connaît deux mécanismes d'insertion de soufre par voie radicalaire décrits dans la littérature. Le premier est celui utilisé par l'isopénicilline synthase. Cette enzyme contient un fer mononucléaire coordonné par deux histidines, un aspartate et une molécule d'eau. Au cours de la réaction une molécule de dioxygène se coordine au Fe^{2+} entraînant la formation d'un intermédiaire Fe(IV)=O et la fermeture du noyau β lactame. Cet intermédiaire Fe(IV)=O arrache l'atome d'hydrogène du groupement isopropyle terminal conduisant à la formation d'une espèce $\text{Fe}^{3+}(\text{OH})$ et d'un radical sur le substrat. Ce radical provoque la rupture homolytique de la liaison Fe-S et conduit par couplage radicalaire à la formation du noyau thiazolidine (Fig II-3).

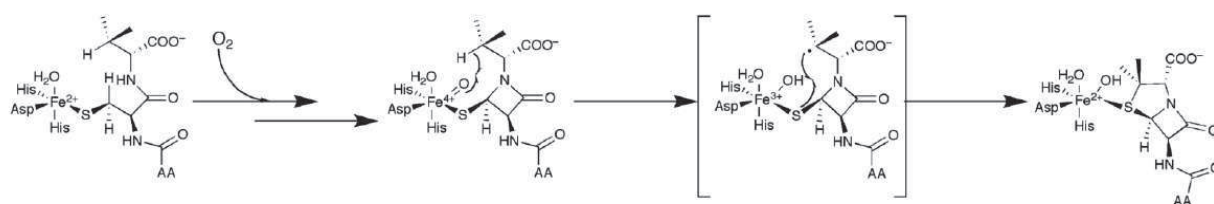


Figure II-3 : Mécanisme réactionnel de l'isopénicilline synthase (reproduit de Booker *et al*, (34)).

Il faut noter que, bien que ce mécanisme fasse intervenir une espèce radicalaire conduisant à la formation d'une liaison C-S, le soufre n'est, à proprement parler, pas inséré puisque déjà présent dans le substrat.

Le deuxième mécanisme d'insertion de soufre par voie radicalaire concerne uniquement un petit nombre d'enzymes appartenant à la superfamille des enzymes Radical-SAM que nous détaillons ci-dessous.

II-3-1) Le radical 5'-désoxyadénosyle.

On connaît plusieurs groupes d'enzymes qui utilisent la chimie radicalaire mais seules deux grandes classes d'enzymes sont capables de produire le radical 5'-désoxyadénosyle (Ado^\bullet) comme initiateur de réaction radicalaire. La première classe utilise un cofacteur organométallique appelé adénosylcobalamine, constitué du coenzyme B12 possédant un groupement adénosyle coordonné au cobalt par le carbone 5'. La rupture homolytique de la liaison Co-CH_2- entraîne la création du radical 5'-désoxyadénosyle (Ado^\bullet) et la formation d'un cobalt au degré d'oxydation II (Fig II-3-1-A).

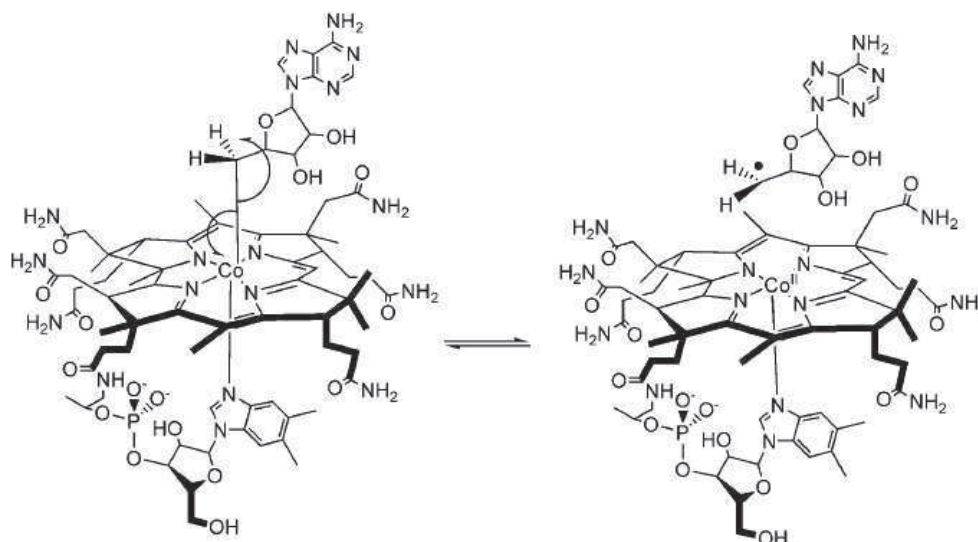


Figure II-3-1-A : Formation du radical 5'-désoxyadénosyle par rupture homolytique de la liaison C-Co de l' adénosylcobalamine (reproduit de Marsh *et al.*, (35)).

Dans la deuxième classe d'enzyme, appelée Radical-SAM, le site actif contient un centre $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ coordonné par trois cystéines. Le 4^{ème} fer est capable de coordonner la SAM par son groupement α -amino-carboxylate. En milieu réducteur le centre $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ catalyse la réaction de réductolyse de la SAM en provoquant la rupture homolytique de la liaison S-CH₂ conduisant à la formation de la méthionine et du radical 5'-désoxyadénosyle (Ado[•]). Cette réaction est remarquable puisque le transfert d'un électron à la SAM conduit à deux oxydants (Ado[•] et $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$) et non pas à une espèce réduite avec son partenaire oxydé comme dans une réaction rédox classique (Fig II-3-1-B).

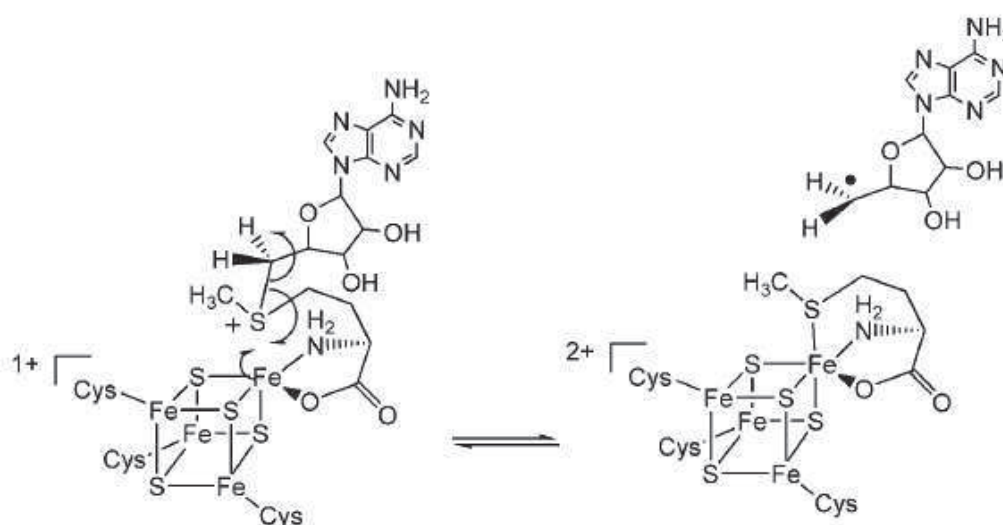


Figure II-3-1-B : Formation du radical 5'-désoxyadénosyle à partir de la SAM au sein d'une enzyme Radical-SAM (reproduit de Marsh *et al.*, (35)).

II-3-2) Les enzymes Radical-SAM : l'exemple de MoaA.

A ce jour, toutes les enzymes Radical-SAM caractérisées se sont avérées capables de générer le radical 5'-désoxyadénosyle. Dans la grande majorité des cas, la présence d'un motif CX₃CX₂C a été proposée comme signature de cette famille d'enzyme (36). Deux exceptions cependant ont été rapportées, ThiC possédant un motif CX₂CX₄C impliquée dans la biosynthèse de la thiamine (61, 62) et l'enzyme HmdB possédant le motif CX₅CX₂C impliquée dans la maturation de l'hydrogénase à fer mononucléaire (37). Etant donné que la liste des enzymes Radical-SAM s'allonge rapidement (35), je ne détaillerai que l'exemple de l'enzyme MoaA impliquée dans la biosynthèse du cofacteur molybdoptérine.

Les enzymes MoaA et MoaC sont impliquées dans la biosynthèse du précurseur Z à partir du GTP. Trois autres enzymes (MoaB, MoaD et MoaE) sont nécessaires pour produire la molybdoptérine (Fig II-3-2-A). L'enzyme MoaA possède deux centres [4Fe-4S] l'un coordonné par les trois cystéines du motif Radical-SAM CX₃CX₂C (N-FeS) et un deuxième centre [4Fe-4S] également coordonné par trois cystéines, dans la partie C-terminale de la protéine (C-FeS) (38).

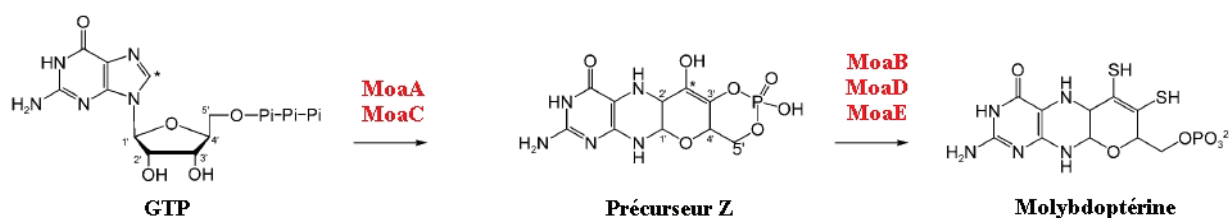


Figure II-3-2-A : Biosynthèse de la molybdoptérine.

Une étude biochimique et structurale récente a montré l'importance de ces deux centres [4Fe-4S] lors de la réaction. Alors que le centre [4Fe-4S] (N-FeS) du site Radical-SAM fixe la SAM, le deuxième centre [4Fe-4S] (C-FeS) présent dans le domaine C-terminal coordine, lui, le GTP, substrat de la réaction (39) (Fig II-3-2-B).

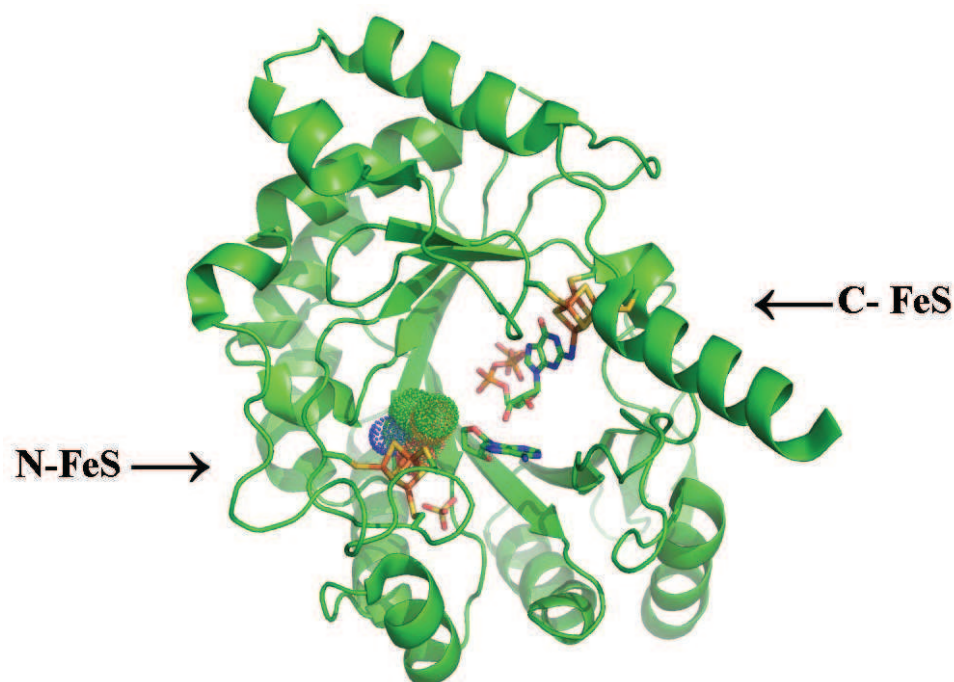


Figure II-3-2-B : Structure de l'holoenzyme MoaA avec ses deux centres [4Fe-4S] à 2,35 Å. Le centre [4Fe-4S]²⁺ du site Radical-SAM de MoaA (N-FeS) après réductolyse de la SAM. La densité électronique représentée sous forme de points figure la méthionine coordonnée au centre [4Fe-4S]. A la droite de celui-ci se trouve la 5'-désoxyadénosine et en dessous un ion SO₄²⁻. Le centre [4Fe-4S] noté C-FeS situé dans la partie C-terminale de la protéine fixe le GTP, substrat de la réaction (PDB : 2FB3).

Comme la plupart des autres Radical-SAM dont la structure a été résolue, l'enzyme MoaA possède un repliement tonneau de type « triose phosphate isomérase » incomplet (TIM barrel). Un repliement de type TIM barrel complet comprend 8 hélices α et 8 feuillets β . Cette structure de MoaA permet de montrer très clairement le rôle de chacun des deux centres [4Fe-4S], la fixation de la SAM sur le cluster N-FeS et la fixation du substrat sur le cluster C-FeS. Une étude par spectroscopie ENDOR avec le substrat marqué (¹⁵N) démontre la coordination du GTP par l'azote N1 de l'adénine (40) (Fig II-3-2-C).

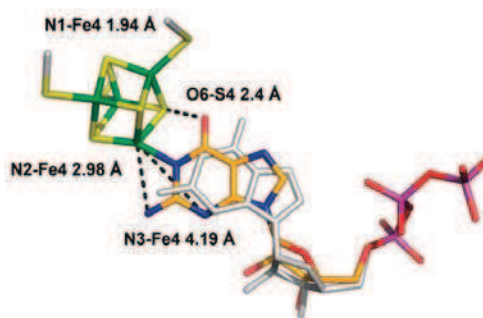


Figure II-3-2-C : Fixation du 5'-GTP sur le centre [4Fe-4S] C-terminal de la protéine MoaA (C: orange; N: bleu ; O: rouge; P: violet). En blanc, la structure du 5'-GTP obtenue à partir de structure cristallographique (2FB3) (reproduit de Lees *et al.*, (40)).

D'autres autres enzymes Radical-SAM activent leur substrat grâce à un deuxième centre [4Fe-4S]. L'enzyme BtrN dont le substrat, la deoxy-scylo-inosamine, est oxydé en position 3 pour donner le 2-amino-deoxy-scylo-inosose (amino-DOI) (Fig II-3-2-D). Cette réaction implique le transfert de deux électrons. En 2010, le groupe de Booker *et al.* (41) a proposé que le deuxième centre [4Fe-4S] de cette enzyme soit impliqué à la fois dans la reconnaissance du substrat et dans des réactions de transfert électronique entre les deux centres.

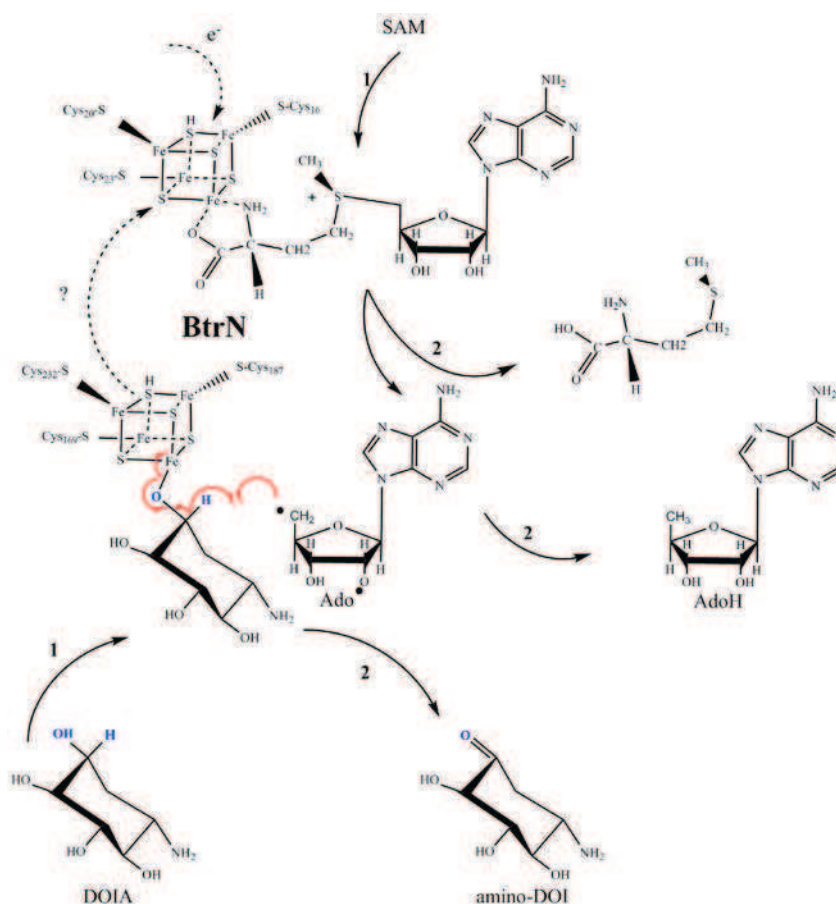


Figure II-3-2-D : Mécanisme enzymatique proposé pour BtrN (Inspiré de Booker *et al.*, (41)).

II-3-3) Les enzymes Radical-SAM et l'insertion radicalaire de soufre.

On connaît actuellement quatre enzymes Radical-SAM impliquées dans l'insertion radicalaire de soufre au sein de biomolécules. Il s'agit de la biotine synthase (BioB), la lipote synthase (LipA) et les méthylthiotransférases MiaB et RimO. Les enzymes de cette sous-classe sont très particulières puisqu'elles réalisent moins d'un cycle catalytique *in vitro*. Ceci

a constitué un obstacle majeur à la compréhension de leurs mécanismes. Dans la période 1990-2005, plusieurs équipes académiques et de grands groupes industriels à travers le monde se sont lancés dans l'étude de ces enzymes dans le but de comprendre les mécanismes d'insertion de soufre par voie radicalaire. Comme nous allons le voir, les connaissances accumulées au cours de ces années n'ont pas permis de répondre à cette question primordiale : Quelle est la nature du soufre inséré lors de la catalyse ?

II-3-3-1) La Biotine synthase (BioB).

II-3-3-1-1) Généralités.

Historiquement, la biotine synthase a été la première enzyme Radical-SAM impliquée dans l'insertion radicalaire de soufre à avoir été étudiée (42). Cette enzyme assure la dernière étape de la biosynthèse de la biotine en insérant un atome de soufre entre les carbones 6 et 9 de la déthiobiotine (Fig II-3-3-1-1). La quantification des deux sous-produits de la réaction (AdoH et méthionine) suggère que deux molécules de SAM sont consommées par molécule de biotine produite (68-70). Par ailleurs, des études de deutériation spécifique ont montré que les positions 6 et 9 étaient impliquées dans la réaction au contraire des positions 7 et 8 (68, 69, 71).

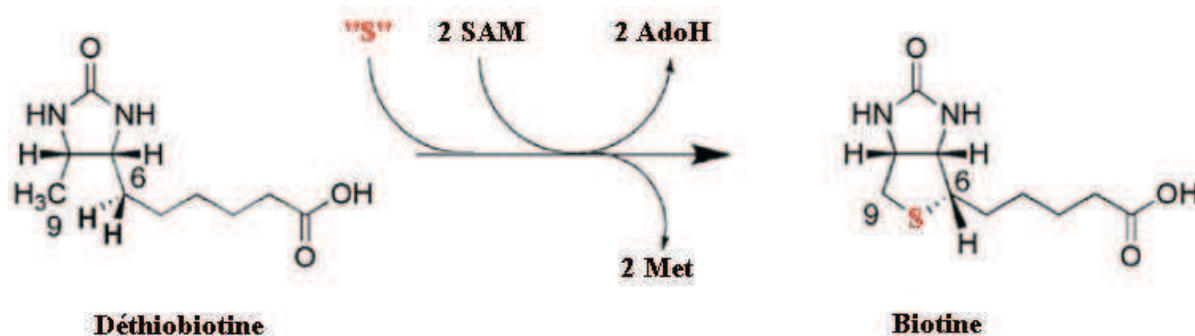


Figure II-3-3-1-1 : Formation de la biotine par la biotine synthase.

II-3-3-1-2) Nature des centres [Fe-S].

L'un des premiers problèmes rencontrés lors de l'étude de la biotine synthase a été de caractériser les centres [Fe-S] de l'enzyme en très sensibles à l'oxygène. Les premières

études réalisées avec la biotine synthase isolée en conditions aérobies ou semi-anaérobies montraient que l'enzyme isolée possède un centre $[2\text{Fe-2S}]$ (72, 73). Cependant, en conditions réductrices, ce centre est converti en centre $[4\text{Fe-4S}]^{2+/+}$ (74-77). Peu après, plusieurs études ont montré que l'holoenzyme pouvait exister sous deux formes selon le protocole utilisé pour la reconstitution des centres FeS à partir de l'apoprotéine: une forme contenant un centre $[4\text{Fe-4S}]$ obtenue en conditions strictement anaérobies et une forme contenant un centre $[4\text{Fe-4S}]$ et un centre $[2\text{Fe-2S}]$ en conditions microaérobies. Cette dernière forme a été reconnue comme la forme active de l'enzyme par la communauté scientifique.

En 2004, le groupe de Drennan, présente dans *Science* la structure tridimensionnelle de l'holo-BioB à une résolution de 3,4 Å (43). Cette structure montre un repliement de type TIM barrel incomplet (inset en haut à gauche, Fig II-3-3-1-2). Un agrandissement du site actif de l'enzyme montre, dans la partie N-terminale, la présence d'un centre $[4\text{Fe-4S}]$ (N-FeS) coordonné par les trois cystéines du motif Radical-SAM et lié à la SAM par son sous-site Fe et celle d'un centre $[2\text{Fe-2S}]$ dans la partie C-terminale de la protéine (C-FeS) (Fig II-3-3-1-2). Comme le centre RS, le centre $[2\text{Fe-2S}]$ est, lui aussi, coordonné par trois cystéines mais, de manière inattendue, le quatrième ligand est une arginine. Cette structure présente l'avantage d'avoir été obtenue en présence de la SAM et du DTB, substrat de l'enzyme, qui se trouve pris en sandwich entre les deux centres.

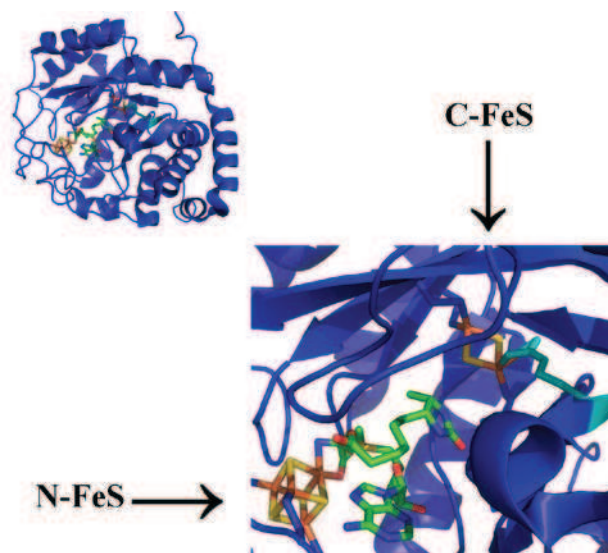


Figure II-3-3-1-2 : Structure de la biotine synthase (inset) et site actif de l'enzyme (droite) à une résolution de 3,4 Å. Le centre $[4\text{Fe-4S}]$ du site Radical-SAM est noté N-FeS alors que le centre $[2\text{Fe-2S}]$ est noté C-FeS. L'arginine 260, ligand atypique, est en couleur cyan. La SAM est coordonnée au site Radical-SAM avec, à sa droite, la déthiobiotine. (PDB : 1R30).

Contrairement à ce que suggère la structure, l'arginine R260 n'est pas essentielle (44). Par contre, l'asparagine N153 et l'aspartate D155 semblent directement impliqués dans le contrôle et le positionnement du radical 5-désoxyadénosyle (45).

II-3-3-1-3) Mécanisme de la biotine synthase : la nature du soufre inséré.

Cycle catalytique.

La biotine synthase est une enzyme non catalytique *in vitro* puisqu'elle réalise moins d'un cycle catalytique. Récemment, il a été rapporté que l'ajout, dans le test d'activité, de nucléosidases qui hydrolysent les différents nucléosides formés dans la réaction (le 5'-methylthioadenosine (MTA), la S-adenosyl-L-homocysteine (SAH), et la 5'-désoxyadénosine (AdoH), permet de doubler le nombre de cycles catalytiques (3,1 biotine / dimère de BioB) (46).

La dégradation du centre [2Fe-2S].

Le suivi de la cinétique par spectroscopie UV-vis suggère que, dans les conditions de catalyse, le centre [2Fe-2S] est consommé au cours de la réaction et sert de donneur de soufre (47). Une étude détaillée de la réaction par spectroscopie Mössbauer montre une dégradation importante (66%) mais incomplète du centre [2Fe-2S] au cours de la catalyse (48). La vitesse de dégradation du centre [2Fe-2S] est environ 10 fois plus rapide que celle de formation de biotine. La quantité maximale de celle-ci est de 0.7 par monomère de BioB après 24 h de réaction.

Mécanisme admis dans la littérature.

Le mécanisme réactionnel généralement admis dans la littérature a été, à l'origine, proposé par Jarrett *et al.* (49) puis repris par les groupes de Marquet et de Johnson. Dans ce mécanisme, le centre [4Fe-4S] catalyse la réductolyse de la SAM pour générer le radical 5'-désoxyadénosyle qui arrache un hydrogène sur le carbone 9 de la déthiobiotine. Ceci entraîne la formation d'un radical-substrat qui réagit avec un des soufre pontants du centre [2Fe-2S] pour former un adduit [Fe-S...DTB] (Fig II-3-3-1-3-A). Un deuxième radical 5'-

désoxyadénosyle est généré et active cette fois le carbone 6 de la déthiobiotine au sein de l'adduit. Le radical en C6 couple avec le radical résultant de l'homolyse de la liaison S-Fe pour former la biotine et un centre [2Fe-2S] dégradé. Cette étape est formellement identique à l'étape de formation du noyau thiazolidine dans la réaction catalysée par l'IPNS (voir plus haut). L'absence d'une machinerie adéquate pour reconstruire ce centre explique le faible nombre de cycles catalytiques effectué par l'enzyme (Fig II-3-3-1-3-A).

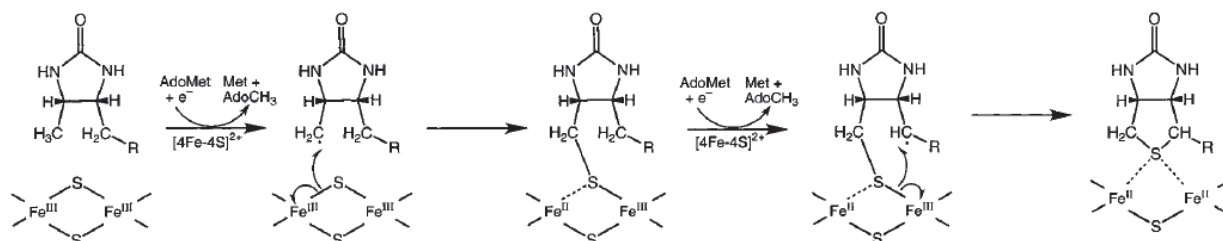


Figure II-3-3-1-A : Mécanisme proposé par l'équipe de JT Jarrett pour le fonctionnement de la biotine synthase (Ugulava *et al.*, (49)).

En 2004, Marquet *et al.* publie une étude comparant l'activité BioB en présence de déthiobiotine ou du 9-mercaptodéthiobiotine (9-DTBSH), intermédiaire postulé de la réaction (50). Le nombre de cycle obtenu est de 1 quelque soit le substrat et les vitesses de réaction sont similaires, montrant que le 9-DTBSH est bien un intermédiaire réactionnel mais que l'insertion du soufre dans le substrat n'est pas, a priori, l'étape limitante de la réaction. Les auteurs s'appuient sur le mécanisme proposé par Jarrett *et al.* pour proposer un intermédiaire réactionnel commun dans les deux cas. Cependant, la formation de cet intermédiaire à partir de 9-DTBSH est a priori énergétiquement défavorable puisqu'elle suppose la rupture de deux liaisons Fe-S, la libération d'un sulfure et d'un proton conjointement à la fixation du 9-DTBSH (Fig II-3-3-1-3-B). Une étude ultérieure du groupe de Jarrett démontre la formation du 9-DTBSH dans des conditions de turnover avec DTB (51).

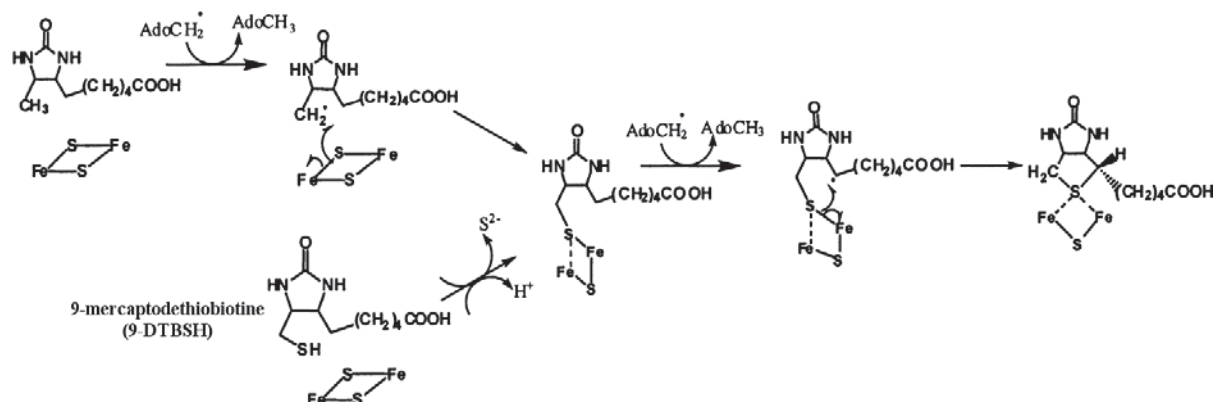


Figure II-3-3-1-3-B : Mécanisme proposé pour la formation de la biotine à partir de la déthiobiotine et de la 9-mercaptodethiobiotine.

D'une manière générale, la structure de la biotine synthase est en accord avec le mécanisme proposé par Jarrett *et al.* (49) puisqu'elle montre la présence de la déthiobiotine entre les deux centres [Fe-S] de telle manière à pouvoir être activée par le radical 5'-désoxyadénosyle produit par le centre [4Fe-4S] du site Radical-SAM tout en étant à la bonne distance pour réagir sur un soufre pontant du centre [2Fe-2S].

Le sélénium comme sonde.

Le groupe de Marquet *et al.* a utilisé le sélénium comme sonde pour démontrer le mécanisme réactionnel de la biotine synthase (52). La réaction de l'enzyme soufrée en présence d'un excès de sélénium (ou de l'enzyme sélénée en présence de sulfure) conduit à un mélange de biotine et de sélénobiotine. Par ailleurs, les auteurs montrent, par spectrométrie Raman, que dans les conditions de la réaction enzymatique, c'est-à-dire en milieu réducteur et en présence de substrat, le sélénium s'échange partiellement avec les soufres pontants du cluster 2Fe-2S. Au contraire, en absence de substrat, cet échange n'a pas lieu. Les auteurs en concluent que la sélénobiotine est formée à partir des atomes de sélénium pontants résultant de cet échange. Cette étude montre l'intérêt du sélénium comme sonde biochimique et spectroscopique.

Le contexte actuel.

Au cours des 20 années que recouvrent les études mécanistiques sur BioB il n'a jamais été rapporté plus de 3,1 cycles catalytiques *in vitro*, encore faut-il préciser que ce dernier résultat a été obtenu en postulant que seul un monomère de l'homodimère est fonctionnel (46). Ainsi, plusieurs auteurs se demandent finalement si la biotine synthase est une enzyme ou simplement un donneur de soufre (88-90) ce qui expliquerait le faible nombre de cycles catalytiques. Comme il est avéré que la biotine synthase est capable d'effectuer plusieurs dizaines de cycles catalytiques *in vivo* (53) l'hypothèse dominante dans la littérature est que, *in vivo*, le centre [2Fe-2S] de la biotine synthase est reconstitué par une protéine « échafaudage » similaire à celles existant dans les machineries ISC ou SUF. Ceci revient à considérer le centre [2Fe-2S] de l'holo-BioB comme un co-substrat (54).

II-3-3-2) La lipoate synthase (LipA).

Le deuxième système enzymatique Radical-SAM catalysant l'insertion de soufre par voie radicalaire à avoir été étudié est celui de la lipoate synthase. Comme nous l'avons vu précédemment dans le cas de la pyruvate déshydrogénase, le lipoate intervient dans le métabolisme oxydatif chez les procaryotes et les eucaryotes (55, 56). La lipoate synthase est impliquée dans la biosynthèse du lipoate (95-97) à partir de l'acyl lipoyl fixé covalamment à la protéine cargo LipB (Fig II-3-3-2). La séquence primaire de la lipoate synthase (LipA) d'*E. coli* contient dans sa partie N-terminale deux motifs pouvant coordonner un centre Fe-S. Le premier est un motif CX₃CX₂C caractéristique des enzymes Radical-SAM et le second, un motif CX₄CX₅C.

Un test d'activité indirect a été mis au point par Marletta *et al* (57) permettant de démontrer que le substrat de LipA est la protéine cargo LipB possédant un groupement octanoyle chez *E. coli*. Une étude récente du groupe de Cronan, a montré que plusieurs familles différentes de protéine cargo sont capables de fixer un groupement octanoyle et interviennent dans la biosynthèse du lipoate notamment LipM chez *B. subtilis* (58). Les premières caractérisations spectroscopiques ont montré la présence d'un seul centre [4Fe-4S] par monomère de LipA (100, 101) puis la présence de deux centres [4Fe-4S] a été démontrée par Booker SJ *et al*. (59). Ce laboratoire a également montré que deux molécules de SAM sont nécessaires pour catalyser l'insertion des deux atomes de soufre (en rouge "S") (Fig II-3-3-2-A) (60) et que l'insertion de ces deux atomes de soufre implique un seul monomère. Finalement, ces auteurs ont montré que l'holo-LipA forme tout au plus 0,4 lipoate par monomère (61).

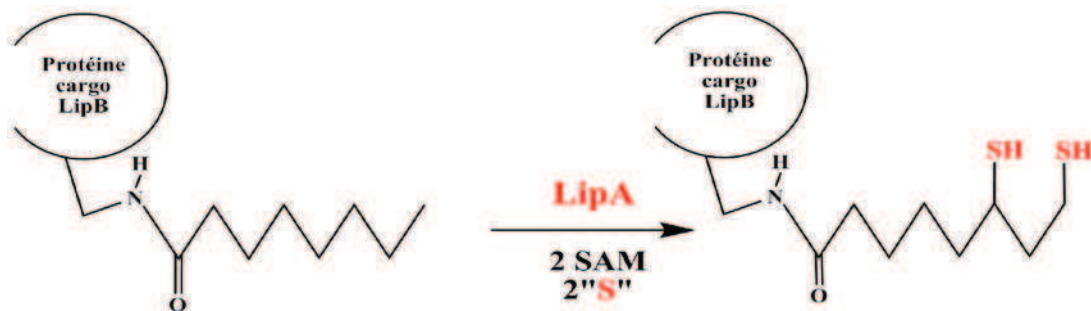
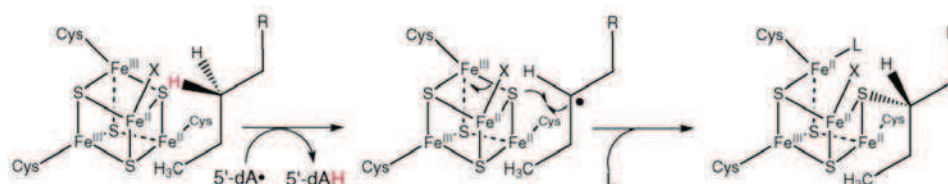


Figure II-3-3-2-A : Production de la lipoate par la lipoate synthase LipA chez *E.coli*.

Le mécanisme proposé par Booker *et al* (62) est calqué sur celui proposé pour BioB. Dans ce mécanisme, le centre $[4\text{Fe-4S}]$ coordonné au motif $\text{CX}_4\text{CX}_5\text{C}$ présent dans le domaine N-terminal est le donneur de soufre (Fig II-3-3-2-B). La première demi-réaction consiste en l'activation du carbone 6 par le radical 5'-désoxyadénosyle, pour donner un « radical substrat » qui réagit sur un soufre pontant du cluster conduisant à un premier intermédiaire. La deuxième demi-réaction avec le radical 5'-désoxyadénosyle a lieu sur cet intermédiaire, permettant cette fois l'activation du carbone 8. Le deuxième « radical substrat » qui en résulte réagit avec un deuxième soufre pontant du centre $[4\text{Fe-4S}]$. Le produit est finalement libéré par l'intervention de deux protons et entraîne la dégradation du centre.

Première demi réaction



Deuxième demi réaction

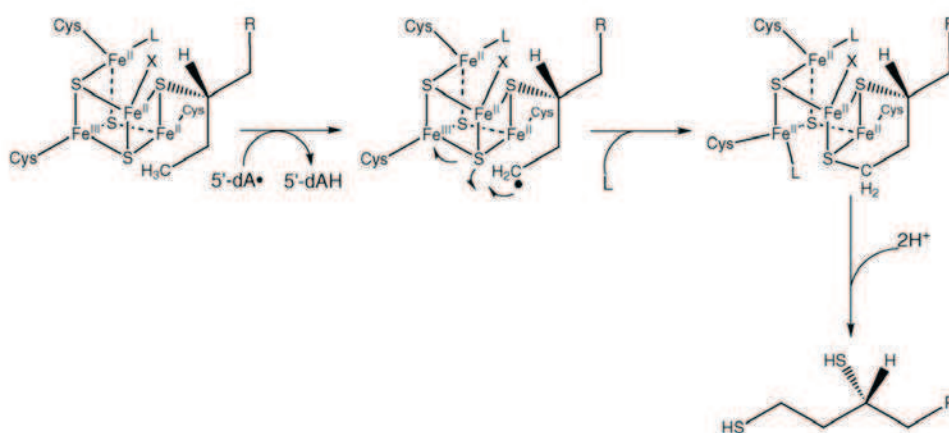


Figure II-3-3-2-B : Mécanisme proposé pour le fonctionnement de la lipoate synthase (reproduit de Booker *et al.*, (62)).

II-3-3-3) La méthylthiotransférase MiaB.

L'équipe « Biocatalyse » du LCBM est engagée depuis de nombreuses années dans l'étude des mécanismes d'insertion de soufre par voie radicalaire. Nous avons vu que les travaux réalisés sur BioB et LipA n'ont pas permis de démontrer clairement la nature du soufre incorporé lors de la catalyse. Le faible nombre de cycles catalytiques obtenus *in vitro*, et le fait que le soufre intervient à la fois dans la construction du cluster et dans la formation du produit des réactions compliquent considérablement l'étude.

C'est dans ce contexte que l'équipe s'est intéressée à la biosynthèse du N⁶-isopentenyl 2-méthylthioadénosine (ms²i⁶A) présent dans tous les ARN de transfert lisant les codons commençant par une uridine (63) (Fig II-3-3-3-A) (à l'exception de l'ARNt^{ser}_{GGA})(64). Lorsque le laboratoire s'est engagé dans cet axe de recherche il avait été montré par des expériences *in vivo* avec de la SAM marquée que le méthyle du nucléoside (ms²i⁶A) provenait de celle-ci (65). L'absence de composé thiométhylé ms²A dans des cellules dont le gène *miaA* était inactivé, a conduit Björk *et al.* (66) à proposer un mécanisme séquentiel dans lequel MiaA intervient pour catalyser l'insertion du groupement isopentényle en position 6 de l'adénosine 37 des ARNt. En 1999, la mutation du gène *miaB* a permis de démontrer l'implication de l'enzyme MiaB dans la voie de biosynthèse de ms²i⁶A (67) à partir d'i⁶A. Suite à ces travaux, l'équipe a mis en place un test d'activité avec l'holo-MiaB d'*E. coli* (68) et l'holo-MiaB de *T. maritima* (69). Enfin en 2004, notre équipe a montré que l'holo-MiaB contenant 4 fer et 4 soufre était bifonctionnelle c'est dire qu'elle intervenait à la fois dans la thiolation et dans la méthylation, permettant la formation du composé thiométhylé ms²i⁶A37 (70).



Figure II-3-3-3-A: Biosynthèse de ms²i⁶A37 à partir de A37 par les enzymes MiaA et MiaB.

Dans cet article est présentée une approche originale pour étudier le mécanisme réactionnel de MiaB qui consiste à utiliser les propriétés du sélénium proches de celles du soufre. Cette approche a été utilisée ensuite par Marquet *et al.* pour l'étude de BioB (voir plus haut). A partir de l'holo-MiaB possédant des centres [4Fe-4Se] reconstitués *in vitro* avec du sélénure, un test d'activité montre la formation de mse²i⁶A (70). Ces expériences ont conduit au mécanisme présenté ci-dessous (Fig II-3-3-3-B). Le radical 5'-désoxyadénosyle arrache le proton en position 2 de l'adénosine 37 (réaction 1 et 2) entraînant la formation d'un intermédiaire « radical substrat » qui réagit avec une source de soufre présente dans l'enzyme

(réaction 3). Après la thiolation, le soufre est méthylé par l'utilisation d'une deuxième molécule de SAM (réaction 4).

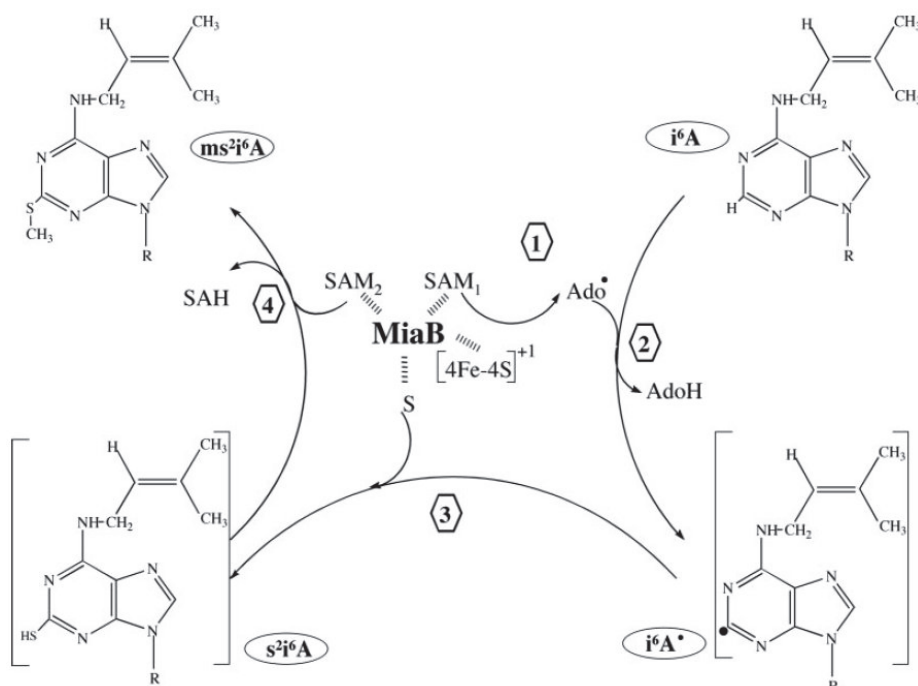


Figure II-3-3-B : Mécanisme proposé pour l'enzyme MiaB (Pierrel *et al.*, (70)).

Plus récemment, l'équipe a montré que l'holo-MiaB possède en fait deux centres [4Fe-4S] (71) l'un coordonné par les trois cystéines du motif Radical-SAM CX₃CX₂C et l'autre par les trois cystéines distantes mais strictement conservées présentes dans le domaine N-terminal de la protéine. Ces préparations sont significativement plus actives que celles contenant 4 Fer et 4 Soufre mais la quantité de produit formé ne dépasse pas 1 ms²i⁶A par monomère (71).

Ainsi, de la même manière que précédemment pour les enzymes BioB et LipA, le nombre de cycles catalytiques effectués par l'holo-MiaB est faible et la nature même du soufre inséré lors de la catalyse reste inconnue.

II-3-3-4) La méthylthiotransférase RimO.

En 1996, Kowalak et Walsh observent par spectrométrie de masse la présence d'une modification sur la protéine ribosomale S12. Les auteurs montrent que l'aspartate D88 (ou 89 si l'on prend en compte la méthionine initiale) est thiométhylé en position β (72) (Fig II-3-3-4-A). En 2009, une étude *in vivo* sur un mutant d'*E. coli*, dont le gène *rimO* a été inactivé,

montre que cette souche ne produit plus de protéine ribosomale S12 thiométhylée. La complémentation avec un plasmide contenant le gène *rimO* permet de retrouver la modification. Les auteurs en déduisent que l'enzyme RimO catalyse l'insertion d'un groupement thiométhyle sur la protéine ribosomale S12 (115) (Fig II-3-3-4-A).

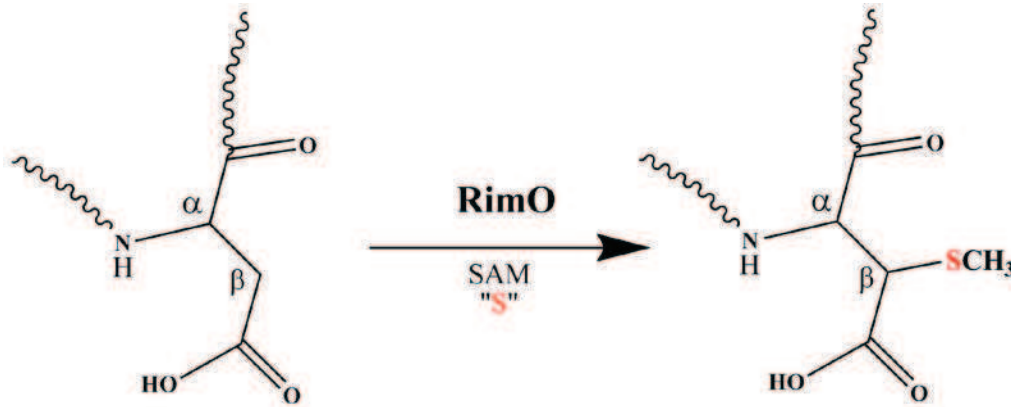


Figure II-3-3-4-A : La réaction catalysée par la méthylthiotransférase RimO sur la protéine ribosomale S12.

Dans le même article Anton *et al.*, présentent une étude bioinformatique des MTTases. Ils définissent trois classes de MTTases bactériennes RimO, MiaB, YqeV et une classe de MTTase présente dans l'organisme *M. jannaschii* nommé Mj0867. Cette classe regroupe la MTTase Mj0867 de *M. jannaschii* (NP-247862) et Mj08-Hsa référencée aussi sous le nom de CDKAL1 chez l'homme (NP-060244) (73) (Fig II-3-3-4-B).

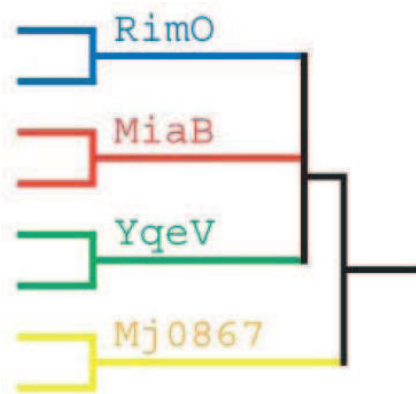


Figure II-3-3-4-B : Arbre phylogénétique des méthylthiotransférases proposé par Anton *et al.* (reproduit de Anton *et al.*, (73))

II-3-3-5) Autres nucléosides thiométhylés.

Quatre autres composés thiométhylés ont été décrits dans la littérature : le 2-méthylthio-N6-méthyladenosine (ms^2m^6A), le 2-méthylthio-N6-(cis-hydroxyisopentenyl) adenosine (ms^2io^6A), le 2-méthylthio-N6-thréonyl carbamoyladénosine (ms^2t^6A) et le 2-méthylthio-N6-hydroxynorvalyl carbamoyladénosine (ms^2hn^6A) (Fig II-3-3-5).

De ces quatre composés thiométhylés, ms^2io^6A est celui dont la biosynthèse est la mieux connue. En effet, suite à la formation de ms^2i^6A catalysé par MiaB l'enzyme MiaE catalyse l'hydroxylation du groupement isopentenyle présent sur les ARNt contenant ms^2i^6A (74).

Une seule publication fait état du nucléoside modifié ms^2m^6A dans les ARNt de la bactérie *Thermodesulfobacterium commune* (75). Bien que l'ensemble du génome ne soit pas définitivement connue, Anton *et al* suggère que l'existence d'un tel composé, nécessitant la présence d'une nouvelle classe de méthylthiotransférase, est peu probable.

Les nucléosides thiométhylés ms^2t^6A et ms^2hn^6A ne diffèrent que par l'ajout d'un groupement méthyle (Fig II-3-3-5). Bien que ces deux composés soit structuralement proches aucune enzyme impliquée dans ces thiométhylations n'a été rapportée dans la littérature. Ces deux composés ont été détectés dans les ARNt de *T. maritima* (75). Cependant, contrairement à ms^2hn^6A , la présence de ms^2t^6A a été confirmée dans d'autres organismes dont la bactérie *B. subtilis* (76, 77), dans le cotylédon de concombre (78), et chez l'Homme (79, 80). Il a été montré que t^6A est formé sur les ARNt possédant un codon de type ANN (81, 82).

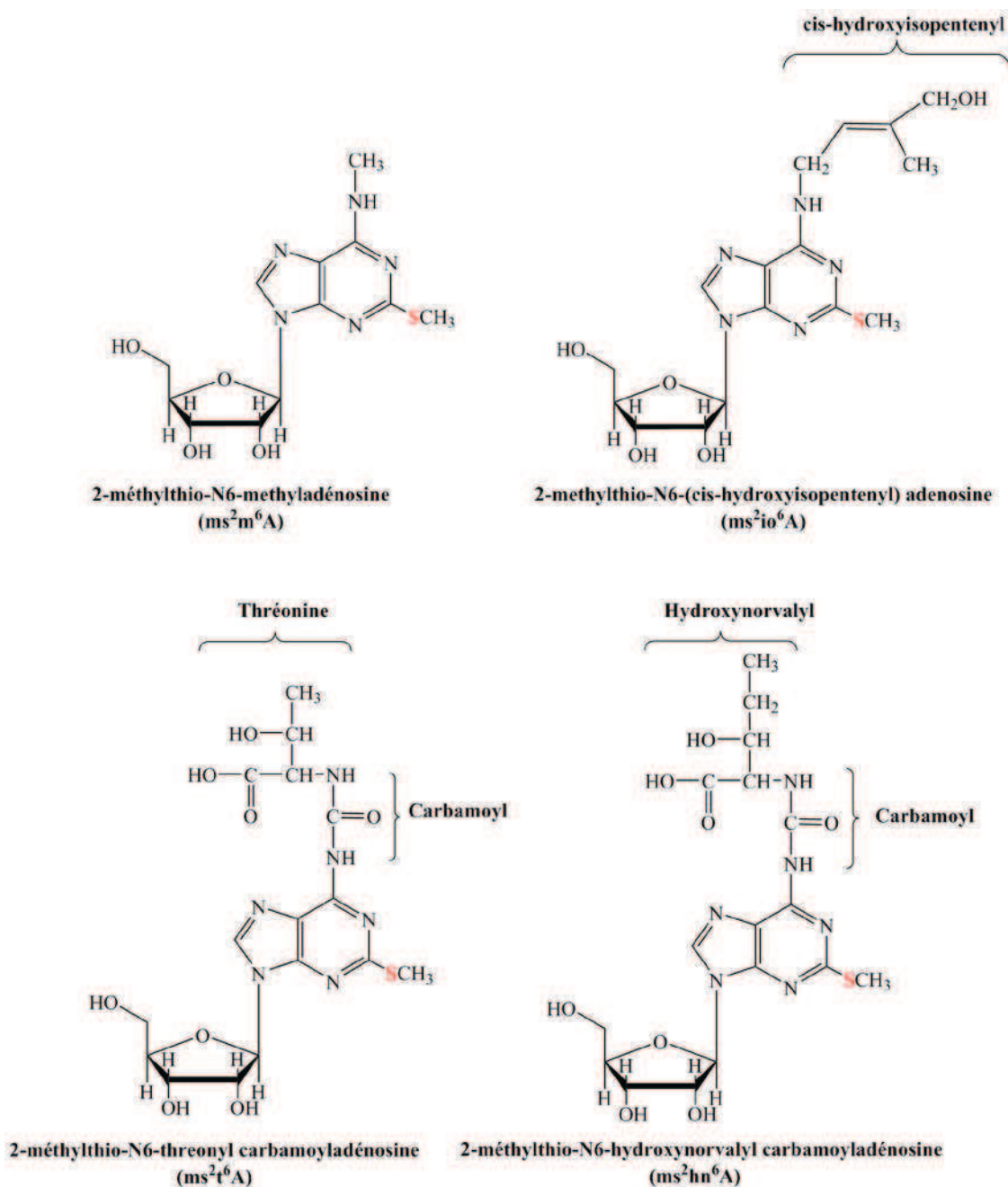


Figure II-3-3-5) Structure des composés thiométhylés ms^2m^6A , ms^2io^6A , ms^2t^6A et ms^2hn^6A .

III) Définition du projet.

Notre objectif est d'élucider les mécanismes réactionnels des enzymes Radical-SAM impliquées dans l'insertion de soufre par voie radicalaire. Pour cela, nous avons choisi de travailler sur les MTTases.

III-1) Etude de la méthylthiotransférase RimO (Chapitre I).

Après surexpression hétérologue de la protéine RimO de *T. maritima* chez *E. coli*, l'apo-RimO a été purifiée. Les deux centres [4Fe-4S] présents dans l'holo-RimO ont été caractérisés par des techniques biochimiques (dosage du fer, dosage du soufre) et spectroscopiques (Mössbauer, Résonance Paramagnétique Electronique). Un test d'activité enzymatique de RimO, avec un peptide mimétique de 20 acides aminés, a permis d'obtenir 2,3 cycles catalytiques par monomère d'enzyme. La résolution de la structure de apo-RimO a permis de montrer que l'enzyme est organisée en 3 domaines avec dans la partie N-terminale le domaine UPF0004, au centre le domaine Radical-SAM avec le motif CX₃CX₂C et dans la partie C-terminale le domaine TRAM. Cette structure de l'apo-RimO a permis d'expliquer le rôle du domaine TRAM dans la fixation de la protéine ribosomale S12.

III-2) Etude du mécanisme de MiaB et RimO (Chapitre II).

Dans ce chapitre sont présentées les études mécanistiques réalisées sur les deux MTTases MiaB de *T. maritima* et RimO de *T. maritima*. La structure cristallographique de l'holo-RimO a été obtenue à 3,4 Å. Il s'agit de la première structure d'une MTTase contenant deux centres [4Fe-4S] séparés par seulement 8 Å. La présence d'une chaîne de 5 atomes de soufre coordonnés par ces deux centres [4Fe-4S] suggère que l'enzyme est capable de stocker du soufre. Sur cette base nous avons ensuite trouvé des conditions expérimentales permettant l'obtention de plusieurs cycles catalytiques *in vitro* avec les deux MTTases RimO et MiaB. Dans le but d'élucider la nature de l'espèce soufrée lors de la catalyse, nous avons utilisé des techniques RPE (RPE en bande X, HYSCORE) pour montrer le rôle du sulfure, du méthylthiolate (CH₃S⁻) et du méthylsélénate (CH₃Se⁻) dans le test d'activité. Ces résultats sont compatibles avec deux mécanismes réactionnels et sont discutés.

III-3) Etude bioinformatique des méthylthiotransférases et découverte des classes fonctionnelles MtaB et e-MtaB (Chapitre III).

Une étude bioinformatique a été entreprise qui a permis de définir 5 classes de méthylthiotransférases (MTTase). Nous avons étudié *in vivo* dans l'organisme *E. coli* la fonction des gènes *cdk11* de *M. musculus* et de son homologue bactérien *yqeV* de *B. subtilis*. Après surexpression des protéines Cdk11 et YqeV, nous avons pu montrer que les ARNt de ces deux souches contenaient le nucléoside hypermodifié ms²t⁶A. Ces expériences démontrent

que les gènes *yqeV* de *B. subtilis* et *cdkall* de *M. musculus* codent pour des MTTases qui catalysent la thiométhylation des ARNt possédant t⁶A.

Matériels et méthodes.

I) Matériel biologique à disposition au laboratoire.

I-1) ADN génomique.

Thermotoga maritima : ADN génomique issu d'une souche DSMZ3109, don du Professeur Robert Huber de l'université de Regensburg (Allemagne).

Bacillus subtilis : ADN génomique issu de la souche sauvage MGNA-A001.

Pyrococcus abyssi : ADN génomique issu d'une souche *Pyrococcus abyssi* GE5 souche Orsay, souche décrite par Erauso *et al.* (83), don du Dr Arnaud Hecker de l'institut de Génétique et de Microbiologie (Orsay, France).

I-2) Souches bactériennes utilisées.

I-2-1) *E. coli* DH5 α .

Génotype : F⁻ *endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG* Φ 80*lacZ* Δ M15

Δ (*lacZYA-argF*)U169, *hsdR17*(r_K⁻ m_K⁺), λ -

Fonction : Souche utilisée dans le but de constituer des stocks de plasmide.

I-2-2) *E. coli* BL21(DE3).

Génotype : F⁻ *ompT gal dcm lon hsdSB*(r_B⁻ m_B⁻) λ (DE3 [*lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5*]).

Fonction : Souche utilisée dans le but de surproduire une protéine dont le gène a été cloné en aval du promoteur T7. Le répresseur LacI inhibe la transcription du gène d'intérêt et l'addition d'IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside), (analogue non hydrolysable de l'allolactose) lève cette inhibition lorsqu'il est ajouté dans le milieu de culture.

I-2-3) *E. coli* BL21 Codonplus® (DE3)-RIL.

Génotype : F⁻ *ompT hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) *dcm*⁺ Tet^r *gal* λ(DE3) *endA* Hte [*argU ileY leuW* Cam^r].

Fonction : Cette souche permet la surexpression hétérologue d'une protéine d'intérêt dans *E. coli* grâce à la présence de plusieurs copies des gènes *argU*, *ileY*, and *leuW* codant pour des ARNt rares chez *E.coli* et reconnaissant respectivement les codons AGA/AGG, AUA, et CUA .

I-2-4) *E. coli* MiaB⁻ (TX3346).

Génotype : F⁻ *lacI*378 *lacZ*-GCG *proB*⁺/*ara* Δ (*lac-pro*) XIII *miaB* ::Tn10dCm

Fonction : Souche *E.coli* dont le gène *yleA* a été inactivé. Cette souche produit des ARNt possédant un groupement isopentényle sur l'adénosine 37 (i⁶A).

I-2-5) *B. subtilis* (MGNA-A001) : souche sauvage de *B. subtilis*.

Génotype : Δ*TrpC2*

Fonction : Souche sauvage de *B. subtilis* utilisée comme référence lors des expériences de complémentation.

I-2-6) *B. subtilis* *yqeV*⁻ (souche MGNA-C496).

Génotype : Δ*yqeV*

Fonction : Souche de *B. subtilis* dont le gène *yqeV* a été inactivé. Utilisée lors des expériences de complémentation pour démontrer le rôle de ce gène.

I-3) Les plasmides.

I-3-1) RimO-Tm-pET3b.

Le vecteur pET3b a été utilisé par le Dr. Fabien Pierrel pour cloner le gène *yliG* de *T. maritima* qui a ensuite été renommé *rimO* (73). Ce gène a été cloné dans le site multiple de clonage au niveau des sites de restrictions *Nde* I et *BamH* I. La sélection des clones recombinant est effectuée grâce à la présence du gène de résistance à l'ampicilline.

I-3-2) RimO-Tm-pET21d.

Le gène *rimO* de *T. maritima* a été cloné par le consortium américain « NorthEast Structural Genomics » (NESG). Cette construction permet la surproduction d'une protéine nommée RimO-6H possédant une extension de 6 histidines (LEHHHHHH) à l'extrémité N-terminale de la protéine.

I-3-3) MiaB-Tm-pT7-7.

Le gène *miaB* de *T. maritima* a été cloné par le Dr. Fabien Pierrel au cours de sa thèse, dans le plasmide pT7-7. Le plasmide MiaBC150/154/157A-pT7-7 code pour une protéine MiaB mutante que l'on nomme MiaB3M-Tm dont les trois cystéines du motif Radical-SAM ont été remplacées par des alanines. Le mutant MiaBC10/46/79A-pT7-7 a été construit par le Dr. Cécile Tron. Il s'agit d'une forme modifiée de MiaB dont les trois cystéines du domaine N-terminal (C10, C46, C79) ont été remplacées par des alanines. La protéine correspondant à ce mutant est appelée MiaBM3-Tm.

I-3-4) Cdkal1-Mm-pGEX6P1.

Le plasmide pGEX6P1 fait partie de la famille de plasmide pGEX commercialisé par la société GE Healthcare (84). Le plasmide pGEX6P1 permet de fusionner un gène d'intérêt avec le gène de la glutathion-S-transférase. Le plasmide Cdkal1-Mm-pGEX6P1 a été construit par le Dr. Fan Yan (Kumamoto, Japon) à partir d'un clone commercial (Invitrogen). Ce plasmide contient la forme complète du gène *cdkal1* de souris (*M. musculus*, BSU25430).

I-4) Milieu de culture.

Le milieu LB (*Lysogeny Broth*) est stérilisé (20 min, 120°C) puis utilisé pour faire croître les différentes souches de cellules bactériennes en milieu aérobie à 37°C. Pour la culture des bactéries sur milieu solide, des boîtes de Pétri LB-Agar stériles sont préparées et les antibiotiques nécessaires sont ajoutés (Ampicilline 100 µg/mL, Chloramphénicol 50 µg/mL, Kanamycine 5 µg/mL, Erythromycine 0,3 µg/mL).

II) Biologie Moléculaire.

II-1) Cellules compétentes et transformation.

Les cellules sont mises en culture toute la nuit à 37°C dans 5 mL contenant l'antibiotique approprié. 10 mL de milieu LB sont inoculés avec la culture en phase stationnaire et incubés (37°C, 200 rpm) jusqu'à l'obtention d'une densité optique à 600 nm égale à 0,4. Les cellules sont culottées (10 min à 5000 rpm, 4°C) et incubées dans la glace 10 min puis le culot est séché pendant 1 minute sous hotte à flux laminaire pour être repris dans 5 mL de solution stérile de CaCl₂ à 100 mM. Après incubation pendant 30 minutes dans la glace, les cellules sont culottées (10 min à 5000 rpm, 4°C), puis le culot est séché pendant 1 min sous hotte à flux laminaire pour être finalement repris dans 0.7 mL de solution stérile de CaCl₂ à 100 mM contenant 10% de glycérol. Des aliquots de 200 µL sont préparés et congelés immédiatement dans l'azote liquide. Pour réaliser une transformation, un volume de 100 µL de cellules *E. coli* compétentes est décongelé puis mélangé avec 2 µL de solution plasmidique. Après incubation dans la glace pendant 30 min, un choc thermique est réalisé (1' 30'' à 42°C) puis 900 µL de solution LB stérile sont ajoutés sous hotte à flux laminaire. Les cellules sont ensuite incubées à 37°C pendant 2 heures, avant d'être étalées sur milieu solide LB-Agar contenant les antibiotiques appropriés (M&M I-4).

II-2) Amorces PCR pour amplification de gène à partir d'ADN génomique.

L'amplification d'un gène par la technique de la PCR (Polymerase Chain Reaction) nécessite la synthèse d'amorces simple brin. Cette technique, qui ne sera pas détaillée ici, a été utilisée pour amplifier spécifiquement les gènes TM1505, TM1862, BSU25430, TM0830, BC016073 et PAB1134. L'amplification est réalisée dans un volume final de 50 µL et l'on ajoute 1 µL d'une solution d'ADN génomique entre 5 et 50 ng/µL, 1µL de chacune des deux amorces (codant et non codant) à 100µM, 1 µL ADN polymérase *Pwo* et 2 µL de dNTP à 10mM, avec 5 µL de solution tampon de *Pwo* 10x (qsp H₂O à 50µL) contenant des ions Mg²⁺ (Roche). La présence et la taille des produits PCR sont vérifiées sur gel d'agarose à 1% (Tableau II-2).

Nom du Plasmide ^(a)	Séquence des amorces ^(b)	Conditions de PCR ^(c)	Matrice ADN génomique ^(d)
TM1505 S12-Tm-pT7-7	5'_GAAGGGAGGATGCATATGCCAACGATAC_3' (<i>Nde</i> I) 5'_CTCTATTATAAGCTTTGCAACAAG_3' (<i>Hind</i> III)	30'' à 94°C 1' 30'' à 55°C 2' à 72°C 25 cycles	<i>T. maritima</i>
TM1862 RimO-Tm-pT7-7	5'_GGAAAATGATCATATGAGGGTTGG_3' 5 (<i>Nde</i> I) 5'_GAAAAAAGCTTGCAAGATTCATATCAC_3' (<i>Hind</i> III)	30'' à 94°C 1' à 55°C 2' à 72°C 25 cycles	RimO-Tm-pET3b
BSU25430 YqeV-Bs-pT7-7	5'_GAGGTGATCACATATGGCAACTGTTGCTTTC_3' (<i>Nde</i> I) 5'_GTGACAGCTCTTTTATTTCTGCAGCTTACAAAC_3' (<i>Pst</i> I)	30'' à 94°C 1' à 55°C 2' à 72°C 25 cycles	<i>B. subtilis</i>
BSU25430 YqeV-Bs-pDG148	Amorce « sens » : 5'_AAGGAGGAAGCAGGTATGGCAACTGTTGCTTTCCATACGCTTGGCTG_3' Amorce « antisens » : 5'_GACACGCACGAGGTTTAAGAAGACAAACGCATGTGTTCAGTTATTTC_3'	30'' à 94°C 1' à 60°C 8' à 72°C 20 cycles	<i>B. subtilis</i>
TM0830 YqeV-Tm-pT7-7	5'_GGAGGGGAAGCTGGACATATGAAAACGTGCAGG_3' (<i>Nde</i> I) 5'_CACCGCTCCCTGAAGCTTCTTTCAAACAGAGAGAAATCC_3' (<i>Hind</i> III)	30'' à 94°C 1' à 55°C 2' à 72°C 30 cycles	<i>T. maritima</i>
BC016073 Cdkal1-Mm-pT7-7	5'_GGAATCCCGCATATGCCTTCTGCGTCTTGTGATG_3' (<i>Nde</i> I) 5'_CATGTGTCAAAGCTTTTACCGTCATCAC_3' (<i>Hind</i> III)	30'' à 94°C 1' à 55°C 2'30 à 72°C 25 cycles	Cdkal1-Mm-pGEX6P1
PAB1134 Cdkal1-Pa-pT7-7	5'_GGGAGTTCGTTGGTCAATATGGTCAAGATTTAC_3' (<i>Nde</i> I) 5'_CTTTAAATCTGAAGCTTCCACAACCTTTTAGG_3' (<i>Hind</i> III)	30' à 94°C 1' à 55°C 5' à 72°C 30 cycles	<i>P. abyssi</i>

Tableau II-2 : Conditions de PCR et séquences des amorces. Nom des plasmides créés (a) à partir des amorces dont la séquence est donnée (b) avec les sites de restrictions introduits soulignés en noir et les enzymes utilisées notées entre parenthèses. Les conditions utilisées, pour la réaction de PCR, sont décrites (c) ainsi que l'ADN génomique utilisé comme matrice (d). Toutes ces amplifications par PCR commencent avec un cycle dénaturation de la matrice pendant 2 min à 94°C et se terminent avec un cycle de 10 min à 72°C. Les amorces possédant le site de restriction *Nde* I s'hybrident au brin non codant (b) alors que celles possédant les sites de restrictions *Sal* I, *Hind* III, *Pst* I et *Bam* HI s'hybrident au brin codant.

II-3) Amorces PCR pour l'insertion d'une ou plusieurs mutations par mutagenèse dirigée.

La même technique est utilisée avec des amorces qui ne possèdent pas de sites de restriction mais des nucléotides spécifiquement modifiés pour introduire une ou plusieurs mutations ponctuelles sur le gène d'intérêt. Au cours de cette expérience, l'ensemble du plasmide, servant de matrice, est amplifié ce qui se traduit par des temps d'élongation plus

longs (Tableau II-3). La mutagenèse dirigée est réalisée selon le protocole habituel (QuickChange Site Directed Mutagenesis, Stratagene).

Nom du Plasmide (a)	Séquence des amorces (b)	Conditions de PCR (c)	Matrice: Plasmide (d)
RimON13C-Tm-pT7-7	Hybridation de cette amorce sur le brin non codant : 5'_AAGGTTCTAGGATGTCCGAAAT <u>TG</u> CGAAGCGGATTGCGAAGTCCTGG_3' Hybridation de cette amorce sur le brin codant : 5'_CCAGGACTTCGCAATCCGCTTCG <u>C</u> ATTTCGGACATCCTAGAACCTT_3'	30'' à 94°C 1'30'' à 60°C 5' à 72°C 25 cycles	RimO-Tm-pT7-7
MiaBN13C-Tm-pT7-7	Hybridation de cette amorce sur le brin non codant : 5'_TTCGGCTGTCAGATGT <u>G</u> CGAGAACGACTCG_3' Hybridation de cette amorce sur le brin codant : 5'_CGAGTCGTTCTCG <u>C</u> ACATCTGACAGCCGAA_3'	30' à 94°C 1' à 60°C 8' à 72°C 25 cycles	MiaB-Tm-pT7-7
MiaB3MN13C-Tm-pT7-7	Hybridation de cette amorce sur le brin non codant : 5'_TTCGGCTGTCAGATGT <u>G</u> CGAGAACGACTCG_3' Hybridation de cette amorce sur le brin codant : 5'_CGAGTCGTTCTCG <u>C</u> ACATCTGACAGCCGAA_3'	30' à 94°C 1' à 60°C 8' à 72°C 20 cycles	MiaB3M-Tm-T7-7
MiaBN13A-Tm-pT7-7	Hybridation de cette amorce sur le brin non codant : 5'_TTCGGCTGTCAGATG <u>G</u> CCGAGAACGACTCG_3' Hybridation de cette amorce sur le brin codant : 5'_CGAGTCGTTCTCG <u>G</u> CATCTGACAGCCGAA_3'	30' à 94°C 1' à 60°C 8' à 72°C 18 cycles	MiaB-Tm-pT7-7
MiaB3MN13A-Tm-pT7-7	Hybridation de cette amorce sur le brin non codant : 5'_TTCGGCTGTCAGATG <u>G</u> CCGAGAACGACTCG_3' Hybridation de cette amorce sur le brin codant : 5'_CGAGTCGTTCTCG <u>G</u> CATCTGACAGCCGAA_3'	30' à 94°C 1' à 60°C 8' à 72°C 20 cycles	MiaB3M-Tm-pT7-7
YqeV3M-Bs-pT7-7	Hybridation de cette amorce sur le brin non codant : 5'_ATACAGGAGGGCG <u>C</u> CAATAATTTCCGACATTCG <u>C</u> TATCATTCCGTGGGC_3' Hybridation de cette amorce sur le brin codant : 5'_GCCCACGGAATGATAG <u>C</u> GAAATGTGGCGAAATTATTGGCGCCCTCCTGTAT_3'	30' à 94°C 1' à 60°C 8' à 72°C 20 cycles	YqeV-Bs-pT7-7
Cdkal13M-Mm-pGEX6P1	Hybridation de cette amorce sur le brin non codant : 5'_CCATCAACACGGGGGCTCTCAATGCTG <u>C</u> TACCTACG <u>C</u> CAAACTAAACAC_3' Hybridation de cette amorce sur le brin codant : 5'_GTGTTTAGTTTGGCGTAGGTAGCAGCATTGAGAGCCCCGTGTTGATGG_3'	30' à 94°C 1' à 60°C 15' à 72°C 25 cycles	Cdkal1-pGEX6P1

Tableau II-3 : Conditions de PCR pour la mutagenèse dirigée et séquence des amorces. Nom des plasmides créés (a) à partir des amorces dont la séquence est donnée (b) avec les nucléotides mutés soulignés en noir. Les conditions utilisées pour la réaction de PCR réalisée avec l'ADN polymérase *Pfu* (c) ainsi que l'ADN génomique utilisé comme matrice (d). Toutes ces amplifications par PCR commencent avec un cycle dénaturation de la matrice pendant 2 min à 94°C et se terminent avec un cycle de 10 min à 72°C.

II-4) Clonages.

II-4-1) Ligation.

Les produits PCR possédant la taille attendue sont purifiés (Bio Basic, EZ-10 Spin Column Kit) et élués dans 50 µL de solution aqueuse puis dosés par mesure de l'absorption à 260 nm (Nanodrop). Le rapport d'absorbance A_{260}/A_{280} permet d'évaluer la qualité de la purification. Lorsque celui-ci est supérieur à 1,8, la solution d'acides nucléiques est considérée comme pure. Généralement, les concentrations obtenues sont de l'ordre de 100 ng/µL. Les produits PCR et le plasmide pT7-7 sont digérés (2h à 37°C) en présence des enzymes de restriction présentes dans les amorces PCR (Tableau II-2) selon les conditions données sur le site internet de la société Fermentas puis purifiés (Bio Basic, EZ-10 Spin Column Kit). Lors de l'étape de ligation de l'insert avec le plasmide pT7-7, deux ratios, respectivement 5:1 et 10:1, sont testés (24 h à 20°C).

II-4-2) Clonage indépendant de la ligation (LIC) et électroporation.

La technique du clonage par hybridation est aussi appelée LIC (Clonage Indépendant de la Ligation) a été utilisée pour cloner le gène *yqeV* dans le plasmide pDG148 (85). Les amorces PCR utilisées pour ce type de clonage possèdent des extrémités 5' à bout collant. L'amorce « sens » possède les nucléotides supplémentaires 5'-AAGGAGGAAGCAGGT-3' suivis immédiatement du codon « start », ATG et d'une quinzaine de nucléotides spécifiques du gène d'intérêt, dans notre cas la séquence du gène *yqeV* de *B. subtilis*. De la même manière, l'amorce « antisens » possède sur l'extrémité 5' les nucléotides supplémentaires 5'-GACACGCACGAGGT-3' suivi de la séquence du brin non codant à la fin du gène *yqeV* de *B. subtilis*. Les conditions expérimentales de la PCR nécessaires à l'amplification du gène *yqeV* de *B. subtilis* sont décrites (Tableau II-2).

Les produits PCR sont traités avec l'ADN polymérase du bactériophage T4 en présence de 2,5 mM dATP. D'autre part, le plasmide pDG148 est digéré avec l'enzyme de restriction *Stu* I puis purifié et ensuite traité avec l'ADN polymérase du bactériophage T4 en présence de 2,5 mM de dTTP. La réaction s'effectue dans les conditions expérimentales suivantes : 4 µL du tampon commercial 5X de l'ADN polymérase du bactériophage T4 (Tris-Cl 335 mM, pH 8.8; MgCl₂ 33 mM, DTT 5 mM, (NH₄)₂SO₄ 84 mM), complété par l'ajout de

1 μL d'une solution de DTT à 100 mM pour obtenir une concentration finale en DTT égale à 10 mM. Enfin, 1 μL de l'ADN polymérase commercial (5 U / μL) est ajouté au milieu réactionnel puis le volume est complété à 20 μL . Le mélange réactionnel est incubé 5 min à température ambiante. La réaction est arrêtée par chauffage de la solution pendant 10 min à 70 °C. Les produits traités sont purifiés sur colonne (Bio Basic, EZ-10 Spin Column Kit).

L'étape d'hybridation proprement dite est rapide puisque 0,02 pmole d'insert sont mis en présence de 0,01 pmole de plasmide pDG148 avec 1 μL d'une solution d'EDTA à 100 mM pendant 5 min à température ambiante. Enfin, 2 μL de cette solution sont utilisés pour transformer des cellules DH5 α compétentes (85).

Le protocole IO (Iso-Osmolarity) (86) a été utilisé pour rendre compétentes les cellules de la souche *B. subtilis yqeV⁻* (souche MGNA-C496). Dans la glace, 100 μL de cellules compétentes sont mélangés avec 10 μL de solution stock du plasmide yqeV-Bs-pDG148 possédant une concentration de 50 ng/ μL . La solution est transférée dans une cuvette d'électroporation possédant une largeur entre les électrodes de 0.1 cm (Bio-Rad) puis une décharge électrique entre 1000 et 2500 volts est appliquée. La solution est transférée dans 900 μL de milieu LBSPG contenant 10 % de glycérol et incubée pendant 2 h à 37 °C puis étalée sur boîte LB-Agar contenant 0,3 $\mu\text{g/mL}$ d'erythromycine et 25 $\mu\text{g/mL}$ de kanamycine.

II-4-3) Extraction, purification et solutions de plasmides.

Les stocks de plasmides sont préparés à partir d'une souche *E. coli* DH5 α transformée avec un des plasmides décrits précédemment (M&M I-3; II-2; II-3) et étalée sur boîte de Pétri LB-Agar contenant l'antibiotique approprié. Une colonie est sélectionnée pour inoculer 5 mL de milieu LB qui sont ensuite mis en culture sur la nuit à 37°C. Les cellules sont collectées en phase stationnaire (5 min, 5 000 rpm à 4°C) et le kit Bio Basic (EZ-10 spin column Plasmid DNA MiniPreps Kit) est utilisé pour purifier les plasmides. A la fin de la purification, le plasmide est élué dans un volume final de 50 μL et la concentration de la solution est déterminée à partir de l'absorbance à 260 nm.

III) Méthodes biochimiques

III-1) Expression des enzymes.

III-1-1) Surexpression des protéines thermophiles.

La surexpression de protéines issues d'organismes thermophiles peut se révéler difficile lorsque le clonage est effectué dans une souche éloignée génétiquement de l'organisme du gène d'intérêt. Bien que le code génétique soit strictement conservé dans tous les organismes vivants, la proportion de chaque ARNt est différente selon les organismes ce qui peut se révéler comme facteur limitant lors de la surproduction d'une protéine dont le gène contient des codons « rares » chez *E. coli*. La souche *E. coli* BL21 Codonplus® (DE3)-RIL, contient des copies supplémentaires d'ARN de transferts peu fréquents chez *E. coli* mais utilisées fréquemment chez d'autres organismes. Ceci permet d'améliorer la surexpression hétérologue d'une protéine d'intérêt. Cette souche possède une version du phage λ dans lequel le gène de la T7 polymérase est sous contrôle du promoteur *LacUV5* (87) inductible par ajout d'IPTG.

Après avoirensemencé 1 L de milieu LB par 10 mL de culture en phase stationnaire, les cultures sont incubées à 37°C jusqu'à atteindre une densité optique de 0,6 à 600 nm. La température est alors réduite à 30°C pendant ½ heure puis la surexpression de la protéine d'intérêt est induite par ajout de 100 µg d'IPTG par litre de culture. Après 2 heures d'induction, les cultures sont arrêtées puis les cellules sont centrifugées (4000 rpm, 4°C, 20 min) et reprises dans du tampon Tris-Cl 50 mM pH 8, 50 mM NaCl pour être finalement stockées à - 80°C.

III-1-2) Expression de MtaB-Bs.

Les bactéries recombinantes de la souche *B. subtilis yqeV*⁻ (souche MGNA-C496) possédant le plasmide YqeV-Bs-pDG148, (M&M II-4-2) sont mises en culture. Le gène sous contrôle du promoteur *p_{SPAC}* étant fortement réprimé par la protéine LacI, il est nécessaire d'ajouter 600 µg d'IPTG par litre de milieu de culture pour lever l'inhibition de ce répresseur transcriptionnel. Les cultures sont incubées (37°C, 180 rpm) jusqu'à l'obtention d'une absorbance à 600 nm égale à 1,5. Les cellules sont alors centrifugées (20 min, 5000 rpm) et conservées dans un congélateur à -80°C.

III-2) Production des substrats des enzymes étudiées.

III-2-1) Substrat de l'enzyme RimO.

Le clonage de la protéine S12 de *T. maritima* a été réalisé dans le plasmide pT7-7. Différentes souches *E. coli* ont été testées mais aucune n'a permis d'obtenir la protéine S12 autrement que sous la forme de corps d'inclusion. Après plusieurs essais de purification infructueux, cette stratégie a été définitivement abandonnée au profit de la synthèse commerciale d'un peptide de 20 acides aminés mimant la partie cible de S12. Pour cela, des séquences de protéines ribosomales S12, issues de différentes origines, ont été alignées en utilisant le logiciel ClustalW. L'alignement de séquences a permis de montrer que la protéine S12 a été extrêmement bien conservée au cours de l'évolution. L'acide aspartique en position 89 est parfaitement conservé dans toutes ces séquences de bactéries et se trouve au milieu d'une séquence peptidique consensus de 13 acides aminés.

Sur la base de cet alignement, un peptide de 20 acides aminés a été synthétisé avec, en son centre, l'acide aspartique cible de RimO. Le peptide possède la séquence LVRGGRVKDLPGVRYKIIRG correspondant à une masse molaire de 2254.76 g.mol⁻¹ (ProteoGenix, Oberhausbergen, France).

III-2-2) Substrat de MiaB : l'ARNt^{Phe}.

L'enzyme MiaB est la première thiométhyltransférase à avoir été étudiée au LCBM au cours de la thèse du Dr. Fabien Pierrel. Le gène codant pour l'ARNt^{Phe} a été cloné par le Dr. Fabien Pierrel entre les sites de restrictions *EcoR* I et *BamH* I du plasmide pTrc99B par hybridation de nucléotide. Ce plasmide porte un gène de résistance à la tétracycline.

III-3) Purification des protéines.

III-3-1) Nomenclature des protéines surexprimées.

La nomenclature des protéines surexprimées de manière hétérologue dans la souche *E. coli* BL21 Codonplus® est résumée dans le tableau ci-dessous (Tableau III-3-1). Pour simplifier la nomenclature le nom de l'organisme d'origine n'est pas rappelé puisque les enzymes RimO et MiaB proviennent du seul organisme hyperthermophile *T. maritima*.

Plasmides	Protéine
RimO-Tm-pET3b	RimO
RimO-Tm-pET21d	RimO-6H
RimON13C-Tm-pT7-7	RimON13C
MiaB-Tm-pT7-7	MiaB
MiaBN13C-Tm-pT7-7	MiaBN13C
MiaB3M-Tm-pT7-7	MiaB3M
MiaB3MN13C-Tm-pT7-7	MiaB3MN13C
MiaB3M-Tm-pT7-7	MiaBM3
YqeV-Bs-pT7-7	MtaB-Bs [*]
YqeV-Tm-pT7-7	MtaB-Tm [*]
Cdkal1-Pa-pT7-7	eMtaB-Pa [*]

Tableau III-3-1 : Récapitulatif des protéines surexprimées de façon hétérologue dans la souche *E. coli* BL21 Codonplus® (DE3)-RIL. Les clones recombinants sont sélectionnés sur boîte de pétri LB-Agar contenant de l'ampicilline (100 µg/mL) et de la chloramphénicol (50 µg/mL).^{*} Ces protéines ont été nommées au cours de la thèse.

III-3-2) Préparation des extraits protéiques.

Les cellules sont décongelées et lysées par sonication (1 min à 70 watts) en présence de détergents (0,1% Triton, 0,1% Tween 20) dans la glace. Ce traitement est répété 5 fois. Le lysat est ensuite ultracentrifugé pendant 1h à 45000 rpm (Beckman LE-806 Ultracentrifuge). Le surnageant est récupéré et chauffé 10 min à 75 °C afin de précipiter les protéines d'*E. coli* thermosensibles qui sont ensuite éliminées par centrifugation (20 min à 10000 rpm). Après ce traitement, la protéine surexprimée provenant de l'organisme thermophile *T. maritima* est majoritaire. L'ajout de 65 % de sulfate d'ammonium permet de faire précipiter les protéines de manière réversible et après centrifugation (20', 10000 rpm) le culot de protéines est congelé à – 80°C.

III-3-3) Colonne hydrophobe Butyl-Sépharose.

Les protéines RimO, RimO-N13C, MiaB, MiaB-N13C, MiaB-3M, MiaB3-M-N13C et MiaBM3 ont été purifiées sur une colonne hydrophobe Butyl-Sépharose. Le culot de protéines, obtenu par ajout de 65% de sulfate d'ammonium, est re-suspendu dans le tampon A (Tris-Cl 50 mM, pH 8, 1 M sulfate d'ammonium) puis centrifugé (20 min, 10000 rpm à 4 °C). La solution de couleur brune due à la présence sous-stoechiométrique de centres [Fe-S] est chargée sur la colonne hydrophobe Butyl-Sépharose préalablement équilibrée avec le tampon

A (conductivité égale à 130 mS.cm^{-1}). Après une étape de lavage avec le tampon A (3 volumes colonne), un gradient linéaire de 0 à 100 % de tampon B (Tris-Cl 50 mM pH 8, NaCl 50mM) permet d'éluer la protéine d'intérêt. D'une manière générale, les différents mutants de MiaB et de RimO se comportent de la même manière que les protéines sauvages et l'on observe une élution à partir de 30 % de tampon B (conductivité de 100 mS.cm^{-1}) jusqu'à 50 % de tampon B (conductivité de 70 mS.cm^{-1}). Les fractions les plus pures sont rassemblées et concentrées (cellule Amicon, YM30, Diaflo) et un dosage par la méthode de Bradford permet d'estimer la concentration en protéine.

III-3-4) Colonne Ni-NTA.

Après préparation des extraits solubles dans le tampon A (Tris-Cl 50 mM pH 8, NaCl 50 mM), la solution protéique est chargée sur une colonne d'affinité Ni-NTA (Ni-NTA superflow, Qiagen) préalablement équilibrée dans le tampon A. Après lavage, un gradient sur 2 heures du tampon A vers le tampon B (Tris-Cl 50 mM pH 8, NaCl 50 mM, imidazole 0,5 M) permet l'élution de la protéine RimO-6H entre 10% et 20% de Tampon B. Les fractions pures obtenues sont sélectionnées par analyse sur gel SDS-PAGE 12% puis trois étapes successives de concentration/dilution avec 30 volumes de tampon A (cellule Amicon, YM30, Diaflo) permettent éliminer l'imidazole avant la congélation de la protéine.

III-3-5) Colonne d'affinité Bleu-Sépharose.

La protéine MtaB-Bs est précipitée par ajout de sulfate d'ammonium entre 25 % et 55 % de saturation puis dialysée deux fois contre 60 volume de tampon A (Tris-Cl 10 mM pH 7,5, KCl 100 mM). La solution brune est chargée sur une colonne Bleu-Sépharose, préalablement équilibrée avec le tampon A. La colonne est lavée avec 5 volumes de tampon A puis la protéine éluée avec un gradient linéaire de 0,1 M à 1 M de KCl. Les fractions contenant la protéine MtaB-Bs sont collectées, concentrées, et la solution protéique est amenée à 1 M de sulfate d'ammonium pour être chargée sur une colonne Butyl-Sépharose comme décrit ci-dessus (M&M III-3-3).

III-4) Préparation des apoprotéines.

La solution protéique purifiée précédemment (M&M III-3) et mise en présence de 2 mM dithionite et de 10 mM d'EDTA en boîte à gants (2 heures, 17°C). Dans le cas des protéines RimO, RimO-6H et RimON13C, les protéines sont purifiées dans le tampon A (Tris-Cl 50 mM pH 8, NaCl 50 mM, DTT 5 mM) sur colonne Superdex 75 analytique ou préparative (GE Healthcare). Dans le cas de la protéine MiaB ainsi que des différents mutants, les protéines sont purifiées sur Superdex75 analytique ou préparative dans le tampon A (Tris-Cl 100 mM pH 8, KCl 100 mM, DTT 5 mM). Pour la protéine MtaB-Bs, l'étape de purification sur Superdex75 analytique est réalisée dans le tampon A (Tris-Cl 50 mM pH 8, KCl 250 mM DTT 5 mM). Quelque soit la thiométhyltransférase purifiée, cette étape chromatographique permet d'éliminer l'EDTA-Fe ainsi que le dithionite. Une fois la thiométhyltransférase collectée, elle est concentrée par ultrafiltration sur membrane (cellule Amicon, YM30, Diaflo), puis lavée 3 fois avec les tampons A respectifs de chacune de ces protéines ne contenant pas de DTT. La concentration de l'apoprotéine est déterminée à partir de l'absorbance à 280 nm.

III-5) Reconstitution des centres [4Fe-4S] en boîte à gants.**III-5-1) Reconstitution des centres [Fe-S].**

Les centres [Fe-S] des MTTases sont reconstitués en boîte à gants sous atmosphère contrôlée ($O_2 < 2$ pmm) à 18°C. La concentration est alors ajustée entre 70 μ M et 120 μ M dans le tampon A (Tris-Cl 50 mM pH 8, NaCl 50 mM). Puis sont ajoutés 5 mM de DTT, 10 excès molaire de Fe^{2+} (Sel de Mohr : $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$), 12 excès molaire de L-cystéine et 2 μ M de cystéine désulfurase CSDA d'*E. coli*. La réaction de reconstitution des agrégats [Fe-S] est suivie par spectroscopie UV-visible depuis l'intérieur de la boîte à gants grâce à des fibres optiques reliant la cellule de lecture (trajet optique : 1 mm) à un spectrophotomètre Uvicon XL (Bio-Tek instruments). Lorsque la solution atteint un rapport $DO_{400\text{ nm}} / DO_{280\text{ nm}} = 0.32$, la réaction est arrêtée et la solution est chargée sur une colonne de gel filtration (NAP-25), équilibrée dans le tampon A. Cette colonne permet d'éliminer les molécules de faible poids moléculaire (cystéine, alanine, DTT, Fe^{2+}) en excès. La solution protéique de couleur brune est concentrée par centrifugation (30 kDa Vivaspinn 500, Sartorius stedim).

III-5-2) Reconstitution des centres [Fe-S] pour analyse par spectroscopie Mössbauer.

La spectrométrie Mössbauer (M&M IV-1), nécessite l'utilisation de ^{57}Fe possédant un spin nucléaire. Pour ces reconstitutions, le $^{57}\text{FeCl}_3$ est utilisé à la place du sel de Mohr. La reconstitution des centres $[\text{}^{57}\text{Fe-S}]$ est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment, après détermination de la concentration de la solution stock de $[\text{}^{57}\text{Fe-Cl}_3]$, préparée en milieu très acide (10 N) puis diluée dans un tampon basique (Tris-Cl 1M pH 9) pour amener le pH vers 6.

Une méthode différente (88) a été utilisée pour préparer les échantillons Mössbauer de RimO d'*E. coli* qui permet de s'affranchir des problèmes éventuels de pH. Le ^{57}Fe métal est lavé avec CHCl_3 et dissout dans une solution de H_2SO_4 (2 N) par chauffage à 60°C en conditions anaérobies en respectant la stœchiométrie de 5 moles de H_2SO_4 pour 1 mole de ^{57}Fe . Bien que cette méthode n'ait pas été utilisée pour les préparations Mössbauer de RimO, elle est plus simple d'utilisation et devrait à l'avenir s'imposer.

III-5-3) Amélioration des préparations protéiques.

Les holo-MTTases étudiées étant thermophiles, elles ont été chauffées pendant 30 min à 65°C dans le tampon A (Tris-Cl 10 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, DTT 5 mM) puis purifiées par filtration sur gel (NAP-25). La protéine est ensuite analysée sur Superdex75 afin de vérifier que la fraction monomérique est majoritaire. La solution protéique est concentrée (cellule Amicon, YM30, Diaflo) puis aliquotée et congelée dans l'azote liquide.

III-6) Réduction des centres [Fe-S].

Les centres [Fe-S] des MTTases reconstitués *in vitro* peuvent être réduits par ajout de 10 excès molaire de dithionite. Le tampon Tris-Cl 50 mM pH 8, NaCl 50 mM est utilisé pour la protéine RimO et RimO-N13C et le tampon Tris-Cl 100 mM pH 8, KCl 100 mM est utilisé pour la protéine MiaB ainsi que les différents mutants de MiaB. La réaction peut être suivie par spectroscopie UV-visible et la décroissance de la bande de transfert de charge à 400 nm reflète la réduction des centres [Fe-S] par le dithionite.

III-7) Détermination de la concentration.

La méthode de Bradford a été utilisée pour estimer la concentration protéique tout au long de la purification. Cependant, une fois les protéines pures nous avons procédé à une analyse des acides aminés afin de déterminer le coefficient d'extinction molaire des formes apoprotéines et holoprotéines. L'analyse des acides aminés a été réalisée par le Dr. J-P. Andrieux à Institut de Biologie Structurale (IBS, Grenoble)

Ce calcul est basé sur la détermination du coefficient d'extinction molaire à 280 nm de trois échantillons de concentrations différentes issus d'une même solution stock. Les spectres UV-visible des trois échantillons sont enregistrés de 250 à 850 nm. Le dosage des acides aminés inclut la pesée des échantillons, l'ajout d'un étalon interne (nor-leucine), une étape de séchage et l'hydrolyse acide de la protéine pendant 24 h à 110°C. Les échantillons sont ensuite repris dans le tampon d'analyse et injectés sur une résine échangeuse d'ions. La détection de chaque acide aminé se fait en présence de ninhydrine par mesure de la densité optique à 570 nm et à 440 nm et sa quantification est réalisée par comparaison avec le standard interne. Les acides aminés Cystéine, Méthionine, Tyrosine, Histidine, Arginine et Tryptophane sont détruits au cours de l'hydrolyse et ne sont pas dosés par cette technique.

La séquence de la protéine analysée étant connue, le nombre respectif de chacun des acides aminés permet de déterminer la quantité absolue de protéine, présente dans l'échantillon, exprimée en nmoles par gramme de solution pesée c'est-à-dire en μ moles par litre (μ M). Les différents coefficients d'extinction molaire des protéines sont rapportés dans la partie Résultats.

III-8) Dosage du Fer.

La quantité de fer est dosée par la méthode de Fish (89). Pour établir la courbe étalon, une solution commerciale de Fe^{2+} (1005 $\mu\text{g/mL}$, Aldrich) diluée au 36^{eme} permet d'obtenir une solution de référence à 500 μM de Fe^{2+} et de réaliser des standards contenant respectivement 0, 2, 4, 6, 8 et 10 nmoles de fer dans un volume final de 65 μL . De la même manière, différentes quantités de protéines, entre 0.5 et 2 nmoles, sont mises en solution dans un volume final de 65 μL . Pour améliorer la précision du dosage, les échantillons et les standards sont réalisés en duplicata. L'ensemble des échantillons et des standards sont

dénaturés par incubation avec 45 μL d'acide perchlorique 1M pendant 1 h. Après centrifugation (13K, 10 min) 90 μL de solution sont prélevés auxquels sont ajoutés 72 μL de batho-phénantroline disulfonate (1,7 mg/mL), 36 μL d'ascorbate de sodium (38 mg/mL) et 27 μL d'acétate d'ammonium (solution saturée diluée au 1/3). Après 30 minutes d'incubation à l'ambiante l'absorbance $\text{DO}_{535}\text{-DO}_{680}$ est mesurée sur un spectrophotomètre Cary 1 bio (Varian). La courbe étalon permet d'obtenir la quantité de fer par monomère d'enzyme.

III-9) Dosage du soufre.

Le soufre est dosé par la méthode de Beinert (90). Un cristal translucide de sulfure de sodium (Na_2S , $9\text{H}_2\text{O}$, $M = 240 \text{ g.mol}^{-1}$) est pesé puis dissout à 100 mM dans de la soude 1M. Une solution à 200 μM est obtenue à partir de cette solution stock. Des standards de 0, 2, 4, 6, 8 et 10 nmoles sont préparés dans un volume final de 100 μL . Les mêmes quantités de protéines que celles utilisés pour le dosage du fer (M&M III-8) sont préparées dans un volume final de 100 μL . Les échantillons protéiques ainsi que les standards sont réalisés en duplicata pour améliorer la précision du dosage. Le protocole consiste à dénaturer pendant 3 h la protéine par l'ajout simultané de 300 μL d'acétate de zinc 1% et de 15 μL de soude 3 M provoquant la précipitation immédiate d'hydroxyde de zinc. Après l'étape de dénaturation, les échantillons sont repris par l'ajout simultané de 75 μL de DMPD (1mg/mL, HCl 5N) et de 16 μL de FeCl_3 (3,75 mg/mL, HCl 1N) conduisant à la formation lente de bleu de méthylène. Après 30 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance $\text{DO}_{670} - \text{DO}_{850}$ est mesurée sur un spectrophotomètre Cary 1 bio (Varian). La quantité de soufre par monomère d'enzyme est obtenue en rapportant l'absorbance à celle de la droite standard.

III-10) Dosage du soufre S^0 .

Le dosage du soufre S^0 est réalisé en boîte à gants (91). Dans un volume final de 90 μL (qsp tampon Tris-50 mM pH 8, KCl 100 mM) on place 19,5 nmoles d'holoenzyme MiaB, 5 μL de Tris-Cl 1M pH 8,8 et 2 μL de NaCN 1,5M. Le mélange est incubé 30 min à 65°C. Une fois la solution revenue à l'ambiante, on ajoute 50 μL d'une solution de Zn à 1 % et 60 μL d'une solution de Fe^{3+} (0,75 M dans HNO_3 20%). Un blanc est réalisé en absence de la protéine MiaB. La quantité de $\text{S}(0)$ est directement obtenue par la quantification du complexe $[\text{Fe}(\text{NCS})(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$ formé, elle-même déduite de l'absorbance à 460 nm grâce à la

détermination du coefficient d'extinction molaire du complexe ($\epsilon_{460} = 3130 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) établie indépendamment.

III-11) Extraction et purification des ARN de transfert.

III-11-1) Extraction des ARNt.

Les bactéries sont lysées enzymatiquement avec du lysozyme suivie de trois cycles de congélation/décongélation, ce traitement permet de libérer le contenu intracellulaire ce qui se traduit expérimentalement par l'obtention une solution très visqueuse. Une première ultracentrifugation (20000 rpm, 1 h à 4°C, Beckman LE-806 Ultracentrifuge) permet d'éliminer les débris cellulaires et l'ADN. Le surnageant est récupéré puis une nouvelle ultracentrifugation est réalisée (450000 rpm, 1 heure 4°C, Beckman LE-806 Ultracentrifuge) pour culotter les protéines ribosomales.

Le surnageant ainsi obtenu est traité avec un volume de phénol saturé d'eau. Le mélange est agité vigoureusement pendant 15 min. La solution est centrifugée (8000 rpm, 20 min à 20 °C) puis la phase aqueuse est à nouveau traitée avec un volume de phénol pendant 15 min. Après centrifugation (8000 rpm, 20 min à 20 °C), la phase aqueuse est récupérée, en évitant toute contamination par l'interface phénol/eau puis les acides nucléiques sont précipités par ajout de 250 mM de NaCl et 3 volumes d'éthanol froid conservé à - 20°C. Après 2 heures à -20°C, les acides nucléiques sont centrifugés (8000 rpm, 20 min, 4°C) puis le culot est lavé avec de l'éthanol froid à 70% pour éliminer les sels. Après centrifugation (8000 rpm, 20 min à 4°C) le culot est repris dans le tampon d'équilibration utilisé lors de la purification sur colonne Nucleobond.

III-11-2) Purification des ARN de transfert sur colonne Nucleobond.

Pour préparer les tampons A (Tris- H_3PO_4 100 mM pH 6,3, éthanol 15%, KCl 400 mM) et B (Tris- H_3PO_4 100 mM pH 6,3, éthanol 15%, KCl 650 mM), la quantité de Tris nécessaire est pesée puis la solution est tamponnée par ajout de H_3PO_4 jusqu'à l'obtention du pH désiré. Après ajout du KCl, le volume défalqué du volume d'éthanol, est ajusté et le tampon obtenu est stérilisé. Une fois la solution refroidie l'éthanol est ajouté.

Le culot d'acides nucléiques purifiés précédemment (M&M III-11-1) est repris dans le tampon A (Tris-H₃PO₄ 100 mM pH 6,3, éthanol 15%, KCl 400 mM). La solution est centrifugée (10 min, 8000 rpm 20 °C) et la quantité des acides nucléiques est dosée (spectromètre nanodrop). Un volume de 2 ml de cette solution à 1 mg/ml est chargé sur une colonne Nucleobond AX 500 (Macherey-Nagel) préalablement équilibrée avec le tampon A. Après lavage avec 6 mL de tampon A (Tris-H₃PO₄ 100 mM pH 6,3, éthanol 15%, KCl 400 mM), 1 mL de tampon B (Tris-H₃PO₄ 100 mM pH 6,3, éthanol 15%, KCl 650 mM) est ajouté. Les ARN de transferts sont élués avec 7 mL de tampon (Tris-H₃PO₄ 100 mM pH 6,3, éthanol 15%, KCl 650 mM) et collectés en une seule fraction. Les ARN de transferts sont précipités par ajout d'un volume d'isopropanol froid (2 h à -20°C). Après centrifugation (8 000 rpm, 20 min à 4°C), le culot est lavé avec une solution d'éthanol à 70% (1h à -20°C) pour être finalement repris dans l'eau.

La colonne peut être régénérée par lavage avec 5 CV d'une solution de KCl à 2,5 M suivie de la re-équilibration dans le tampon initial. Une colonne peut servir pour 4 purifications au plus.

III-11-3) Purification de l'ARNt^{Phe}.

Après surexpression de l'ARNt^{Phe} (Thèse, Dr. Fabien Pierrel) et extraction des acides nucléiques, les ARNt sont purifiés selon le protocole décrit ci-dessus sur colonne Nucleobond FPLC, spécialement préparée au laboratoire à partir de la phase de 3 colonnes AX10000 rassemblée dans un corps de colonne Pharmacia Biotech XK50. Le matériel obtenu après Nucleobond est purifié sur colonne d'hydroxyapatite-céramique (CHT20-I, BioRad) préalablement équilibrée avec 75% de tampon A (phosphate de potassium 10 mM pH 6,5) et 25% de tampon B (phosphate de potassium 500 mM pH 6,5). Après lavage de la colonne avec 3CV de ce tampon, un gradient (25→50% B) à 2 mL/min permet l'élution des ARNt. Les fractions d'intérêt sont digérées et analysées par HPLC (Agilent 1100). La quantité d'i⁶A détectée par rapport à la quantité totale d'ARNt injectée, permet de calculer l'enrichissement en ARNt^{Phe}. Les fractions enrichies (65-85 %) sont collectées et utilisées lors des tests enzymatiques.

III-12) Test d'activité de l'holoenzyme RimO.

III-12-1) Conditions expérimentales.

Le protocole des tests d'activité de l'enzyme RimO a évolué au cours de la thèse. En effet, lors des premiers tests le milieu réactionnel (100 μ L) était incubé pendant 1 h à 50°C dans le tampon Tris-Cl 50 mM pH 8, NaCl 50 mM et contenait l'enzyme et le peptide dans un rapport 1 : 5 (Tableau III-12-1). Les produits de la réaction étaient analysés par spectrométrie de masse (M&M III-12-2) et les sous-produits de la réaction analysés sur colonne HPLC C18 (M&M III-12-3).

	HoloRimO	Peptide	SAM	Dithionite
Concentration finale	6 μ M	30 μ M	200 μ M	2 mM

Tableau III-12-1 : Test enzymatique de l'holoenzyme RimO à 20 μ M et à 6 μ M. Conditions expérimentales du test d'activité de l'holoenzyme RimO à 6 μ M.

III-12-2) Analyse par spectrométrie de masse des peptides produits.

La spectrométrie de masse a été réalisée par le Dr. Thierry Douki (INAC, CEA-Grenoble). Une partie du mélange réactionnel, entre 30 μ L et 50 μ L selon les tests enzymatiques réalisés, est analysée sur colonne C4 (5 mm, 2,1 x 150 mm, Deerfield, USA) par HPLC (Agilent 1100) couplée à la spectrométrie de masse (API 3000, triple quadrupole-PerkinElmer Life Sciences) possédant un ionisateur électrospray en mode positif (Turbo Ionspray). La colonne C4 est équilibrée avec 0,1% d'acide formique et un gradient de 0% à 30% d'acétonitrile en 30 minutes est appliqué suivi d'un lavage isocratique à 60% d'acétonitrile pendant 5 min. Les ions peptidiques chargés positivement, sont enregistrés entre $m/z = 380$ et $m/z = 1130$. Les aires de chacun des pics HPLC enregistrés pour chacun des ions peptidiques détectés par le spectromètre de masse, ont été additionnées donnant accès à une analyse quantitative des produits de la réaction.

III-12-3) Analyse HPLC des sous-produits de la réaction sur colonne C18.

Les sous-produits de la réaction sont analysés par HPLC 1100 (Agilent) sur colonne Zorbax SB-C18 (5 μ m, 4,6 x 250 mm) équilibrée dans 0,1 % d'acide trifluoroacétique. L'élution des sous-produits de la réaction est réalisée à 1 mL/min avec un gradient linéaire de 0 % à 28 % d'acétonitrile contenant 0,1% d'acide trifluoroacétique. Les standards possèdent des temps de rétention suivant : SAM (4,7 min), Adénine (7,44 min), SAH (12 min), AdoH (14 min) et MTA (20min).

III-12-4) Analyse HPLC des produits et sous-produit de la réaction sur colonne C3.

Sur la base des expériences réalisées dans le même temps avec l'enzyme MiaB, les conditions expérimentales du test enzymatique de RimO ont été modifiées. Les produits et les sous-produits de la réaction ont été analysés en une seule injection sur colonne HPLC-C3 et soumis à une analyse par spectrométrie de masse.

	HoloRimO	Peptide	SAM	Dithionite
Concentration finale	1 μ M	15 μ M	150 μ M	5 mM

Tableau III-12-4 : Conditions expérimentales du test d'activité de l'holoenzyme RimO.

Les conditions expérimentales utilisées pour l'analyse HPLC/MS sont identiques aux précédentes. Un gradient en acétonitrile contenant 0,1 % acide formique, est réalisé à 0,5 mL/min allant de 0 % à 30 % en 30 min suivi d'un lavage isocratique à 60 % pendant 5 min. L'élution des composés est suivie à trois longueurs d'onde (260 nm, 232 nm, 275 nm). Dans ces conditions, les temps d'élution des différents composés sont les suivants : SAM (1,2 min), Adénine (1,5 min), SAH (2,5 min), AdoH (3,5 min), MTA (6,3 min), peptide (15,4 min).

III-13) Test d'activité de l'holoenzyme MiaB.

Le test enzymatique de l'holoenzyme MiaB est réalisé sous anaérobiose pendant 1 h à 65°C dans un volume réactionnel de 100 μ L avec un rapport enzyme : ARNt^{Phe} de 1 : 20 en tampon Tris-Cl 100 mM pH 8, KCl 100 mM (Tableau III-13). Avant l'analyse HPLC les échantillons sont digérés à 37°C par la nucléase P1 sur la nuit et déphosphorylés par la phosphatase alcaline pendant 2 h à 37°C (M&M III-14-1). Les échantillons sont ensuite centrifugés (10 min, 13000 rpm) puis analysés sur colonne Zorbax SB-C18 (5 μ m, 4,6 x 250 mm) pour leurs contenus en nucléosides modifiés (M&M III-14-2).

	HoloMiaB	ARNt ^{Phe}	SAM	Dithionite
Concentration finale	1 μ M	20 μ M	150 μ M	2.5 mM

Tableau III-13 : Conditions du test d'activité de la protéine MiaB.**III-14) Analyse des ARNt par HPLC.****III-14-1) Digestion des ARN de transfert.**

La quantité d'ARN de transferts digérée peut varier selon les expériences entre 50 μ g d'ARN_t^{Phe} à 85% pure (M&M III-11-3) dans les tests enzymatiques de l'enzyme MiaB jusqu'à 200 μ g d'ARNt n'ayant été purifiés que sur colonne Nucléobond (M&M III-11-2) dans le but de vérifier la présence ou l'absence d'une modification lors de tests de complémentation. 2 U de Nucléase P1 permettent la digestion complète de 100 μ g d'ARNt. La digestion peut être améliorée par ajout de 0,5 unité de phosphodiesterase II. Les échantillons sont incubés une nuit à 37 °C, amenés à pH 8.3 par ajout de 20 μ L de tampon alcalin (Tris-Cl 0,5 M pH 8,3) et traités pendant 3 h à 37°C par 2 U de phosphatase alcaline à pH 8.3 et 0.3 U de phosphodiesterase I. Après centrifugation (10 min, 13000 rpm), les nucléosides sont analysés sur colonne C18 par HPLC en utilisant soit le gradient « court » soit le gradient « long » (M&M III-14-2).

III-14-2) Analyse HPLC des nucléosides modifiés.

Les paramètres d'une analyse très résolutive des modifications d'acides nucléiques ont été publiés par Gehrke *et al* dans *Journal of chromatography* (92). Trois tampons sont nécessaires pour séparer correctement les différents nucléosides modifiés présents dans les ARNt et la préparation de ces tampons est critique pour obtenir des temps de rétention parfaitement reproductibles. Le pH des solutions aqueuses est contrôlé (HI9321 Microprocessor pH meter, HANNA Instruments) et ajusté par ajout de quelques gouttes de (NH₄)₂ HPO₄ (100 mM, pH 7,8). Les solvants (méthanol ou acétonitrile) sont ajoutés après filtration des solutions aqueuses (membrane de 0,2 μ m).

Tampon A (2,5% Méthanol, NH₄H₂PO₄ 10 mM, pH 5,3).

Tampon B (20% Méthanol, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 10 mM, pH 5,1).

Tampon C (35% Acétonitrile, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 10 mM, pH 4,6).

Deux types de gradients sont décrits dans l'article de Gercke *et al* (92). Le premier appelé « court » (75 min) permet l'analyse des nucléosides modifiés sur colonne Zorbax SB-C18 (5 μm , 4,6 x 250 mm). Ce gradient « court » est utilisé pour l'analyse des essais enzymatiques *in vitro* de MiaB. Les deux nucléosides modifiés i^6A et $\text{ms}^2\text{i}^6\text{A}$ sont élués tardivement (48 min et de 55,5 min respectivement). Le deuxième gradient dit « long » (95 min) permet une meilleure séparation des différents nucléosides. Dans ces conditions, les nucléosides t^6A , $\text{ms}^2\text{t}^6\text{A}$, i^6A et t^6A et $\text{ms}^2\text{i}^6\text{A}$ sont élués à 41 min, 52 min, 71 min et 85 min respectivement.

IV) Méthodes biophysiques.

IV-1) Techniques spectroscopiques.

La spectroscopie UV-visible a été utilisée pour déterminer la concentration des apoprotéines et holoprotéines. Les protéines contenant un centre $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ possèdent une bande d'absorption caractéristique vers 400 nm. La reconstitution des centres $[\text{Fe-S}]$ des MTTases est suivie en boîte à gants grâce une cellule reliée à un spectrophotomètre Uvicon XL (Bio-Tek instruments) par des fibres optiques (M&M III-5). En utilisant les coefficients d'extinction molaire des protéines étudiées déterminés par le dosage des acides aminés (M&M III-7), on accède à la concentration des protéines sous forme apo et holo.

La spectroscopie RPE en bande X permet l'étude des espèces paramagnétiques c'est-à-dire possédant un ou plusieurs électrons célibataires non appariés. Cette technique a été utilisée pour caractériser l'enzyme RimO en collaboration avec le Dr. Geneviève Blondin de l'équipe « Physicochimie des Métaux en Biologie » (PMB) dirigée par le Dr. Jean-Marc Latour (LCBM, CEA-Grenoble). Expérimentalement, un volume de 100 μL à 200 μL d'échantillon d'holoprotéine est réduit puis congelé à l'intérieur de la boîte à gant grâce à un puits contenant de l'isopentane refroidi de l'extérieur par de l'azote liquide. Les tubes sont ensuite stockés dans l'azote liquide avant d'être analysés sur un spectromètre Bruker ESP 300E équipé d'un cryostat travaillant à l'Hélium (Cryostat Oxford instruments). Les spectres

RPE sont enregistrés à différentes température (4,2 K, 10K ou 20K) dans des conditions de non saturation du signal.

La spectroscopie Mössbauer a été réalisée en collaboration avec les Drs. Ricardo Garcia et Martin Clemancey de la même équipe PMB. La spectroscopie Mössbauer est une spectroscopie d'absorption des rayons γ entre noyaux possédant le même nombre de masse (^{57}Fe , ^{57}Co). Elle repose sur la détection des différents états de spin du ^{57}Fe (M&M III-5-2) dans un échantillon biologique grâce à l'utilisation d'une source radioactive de ^{57}Co . Cette technique spectroscopique a été utilisée pour caractériser les centres [Fe-S] présents dans l'holo-RimO. Lors de l'expérience, l'échantillon est soumis à un champ magnétique intense et l'on observe pour l'état excité une levée de dégénérescence dont la valeur correspond à l'éclatement quadripolaire ΔE_Q exprimé en mm.s^{-1} . L'autre paramètre obtenu est le déplacement isomérique, noté δ , qui s'exprime en mm.s^{-1} et est corrélé au degré d'oxydation du fer présent dans l'échantillon ($\delta_{\text{Fe}^{2+}} = 0,81 \text{ mm.s}^{-1}$ $\delta_{\text{Fe}^{2,5+}} = 0,53 \text{ mm.s}^{-1}$ dans un centre $[\text{4Fe-4S}]^{1+}$; $\delta_{\text{Fe}^{3+}} = 0,35 \text{ mm.s}^{-1}$ dans un centre $[\text{3Fe-4S}]^0$).

IV-2) Spectroscopie HYSCORE.

IV-2-1) Principe.

La spectroscopie HYSCORE (Hyperfine Sublevel Correlation) permet de visualiser les couplages hyperfins entre un centre métallique $[\text{4Fe-4S}]^+$ paramagnétique et des espèces proches possédant un spin non nul qui peuvent être un atome (^1H , ^{14}N , ^{15}N , ^{13}C , ^{33}S ...) ou un radical. Le détail du fonctionnement de la spectroscopie HYSCORE est décrit dans l'article (93). La spectroscopie HYSCORE permet de mettre en évidence la présence d'un ligand en interaction faible avec le centre $[\text{4Fe-4S}]^+$ dans le quadrant noté (+,+) (Figure IV-2-1(a)) ou un ligand en interaction forte avec le centre $[\text{4Fe-4S}]^+$ dans le quadrant noté (-,+)(Figure IV-2-1(b)). La séquence HYSCORE est donnée en Figure IV-2-1(c)) ainsi que les diagrammes des différents niveaux d'énergie (Figure IV-2-1(d), Figure IV-2-1 (f)) associés respectivement à un couplage faible et à un couplage fort (93).

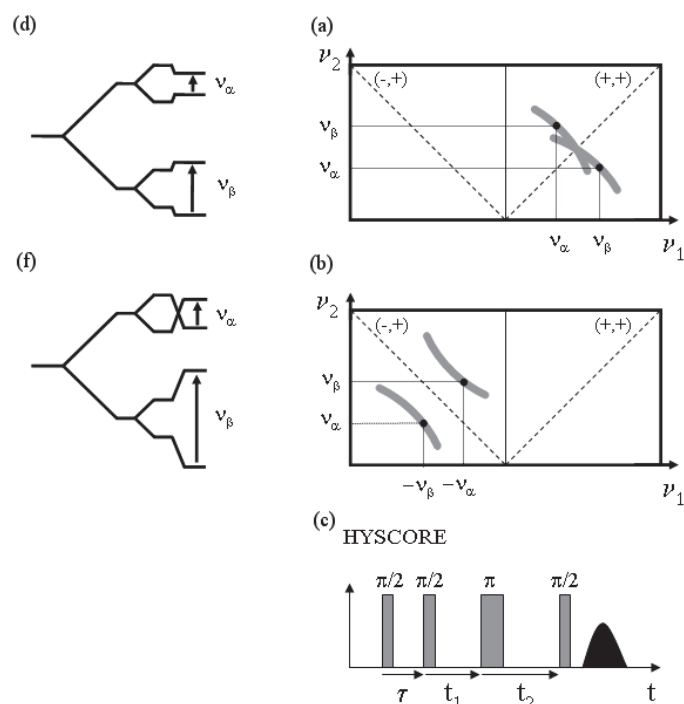


Figure IV-2-1 : Spectroscopie HYSCORE (système $I = \frac{1}{2}$ et $S = \frac{1}{2}$). Un couplage faible (a) est observé dans le quadrant (+,+) avec son diagramme de niveau d'énergie correspondant (d). Un couplage fort (b) est observé dans le quadrant (-,+) avec son diagramme de niveau d'énergie correspondant (f). La séquence HYSCORE utilisée est représentée schématiquement en (c) (93).

IV-2-2) Détection d'un couplage fort entre un centre [4Fe-4S]⁺ et la S-adénosylméthionine (SAM).

Le spectre HYSCORE de la figure IV-2-2 (A) montre que le centre [4Fe-4S]⁺ de l'activase de la Ribonucléotide Réductase (aRNR-AE) ne possède pas de ligand couplé fortement au centre [4Fe-4S]⁺ puisque le quadrant (-,+) ne possède aucune tache de corrélation. Dans le quadrant (+,+), les taches observées sur la diagonale correspondent à des atomes (¹³C et ²H) distants du centre [4Fe-4S]⁺ et donc non couplés à celui-ci. En revanche, l'ajout de 2 mM de SAM se traduit par l'apparition de taches de corrélations dans le quadrant (-,+) correspondant à des interactions double quanta-double quanta et notées dqdq sur le spectre de la figure IV-2-2 (B). L'apparition de ces taches de corrélation montre que la SAM est coordonnée au centre [4Fe-4S]⁺ de l'aRNR-AE.

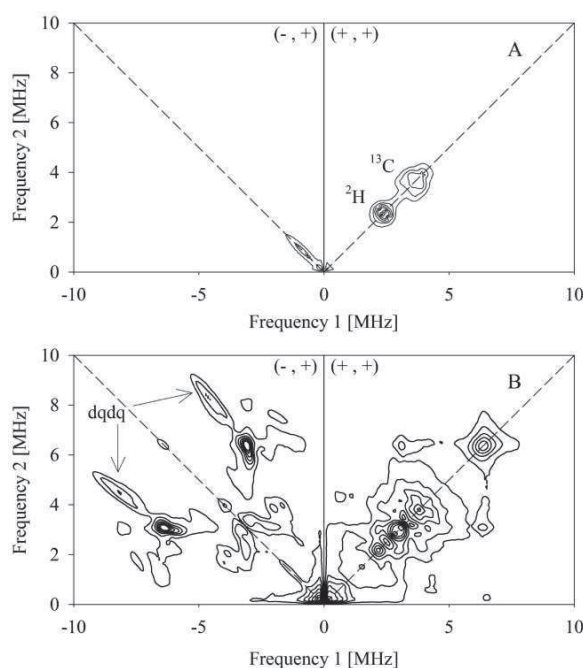


Figure IV-2-2 : Spectre HYSORE en bande X à faible fréquence de l'holo aRNR-AE (800 μM). La protéine est réduite en présence d'un excès de dithionite et de 5 mM de DTT (A). Après ajout de 2 mM de SAM (B). Dans le quadrant (+,+) les taches sont présentes sur la diagonale, correspondant à des atomes (^{13}C et ^2H) distants. Dans le quadrant (-,+) du spectre (B), les taches de corrélation notées dqdq correspondent à une paire de double quanta. Les conditions expérimentales utilisées sont : Fréquence de 9,75 GHz sans SAM et 9,68 GHz avec SAM, Champ magnétique sans SAM : 362 mT et avec SAM : 359 mT, Température 12K, Séquence $\pi/2 - \tau - \pi/2 - t_1 - \pi - t_2 - \pi/2 = 16$ ns, $\tau = 132$ ns, Spectromètre BrukerElexsys E-580 en Band X (93).

IV-3) Cristallographie aux rayons X des thiométhyltransférases.

La cristallographie des rayons X permet d'accéder à la structure tridimensionnelle de la matière ordonnée. L'ensemble de l'étude cristallographique (cristallogénèse, collection des données et résolution de structure) des MTTases a été réalisé en collaboration avec le Dr. Farhad Forouhar du consortium nord américain NESG et le laboratoire du Dr. John Hunt (Columbia University, New-York). A ce jour, deux techniques différentes de cristallisation ont permis d'obtenir des cristaux des thiométhyltransférases MiaB et RimO.

La première technique, utilisée au cours de la thèse du Dr Fabien Pierrel, est la cristallisation par diffusion de vapeur en goutte suspendue. L'apoprotéine MiaB monomérique a été purifiée sur Superdex75 (M&M III-4) en tampon Tris-Cl 50mM pH 8, NaCl 200 mM, DTT 5 mM. Un volume de 2 μL de cette solution de protéine MiaB sous forme apo à 15 mg/mL est mélangé avec 2 μL de solution réservoir (Sulfate d'ammonium 1,5 M, PEG 400

Matériels et méthodes.

5% 5 (v/v), Hepes 50 mM, pH 7,5) puis suspendue sur une lamelle au dessus d'1 mL de solution réservoir (Sulfate d'ammonium 1,5 M, PEG 400 5% 5 (v/v), Hepes 50 mM, pH 7,5).

La technique en Microbatch (Plaques Terasaki, 72 puits) a été utilisée pour la cristallogénèse des deux formes apo et holo RimO. Après reconstitution des centres [Fe-S] en boîte à gants, l'holo-RimO a été purifiée par tamisage moléculaire sur NAP-25 en tampon Tris-Cl 10 mM pH7,5, NaCl 100 mM, DTT 5 mM. Sous huile minérale, un volume de 1-2 μ L d'holo-RimO est déposé au fond d'un puits avec un volume variable de 1-2 μ L de solution réservoir (Thiosulfate de sodium 100 mM, PEG 4000 40%, CAPS 100 mM, pH 10,0). Ces différentes conditions de cristallogène ont été testées avec holo-RimO seule, et en présence de SAM et/ou de peptide mimétique.

Résultats.

I) Caractérisation biochimique, spectroscopique, fonctionnelle et structurale de la thiométhyltransférase RimO.

En 1996, Kowalak *et al.* (72), montrent, par spectrométrie de masse, que l'aspartate 88* de la protéine S12 du ribosome procaryote est modifié par l'ajout d'un groupe thiométhyle, probablement en position β . Une dizaine d'années plus tard, la découverte de l'enzyme responsable de cette modification post-traductionnelle est publiée dans la revue PNAS par Anton *et al.* (73). Dans cet article, les auteurs analysent, également par spectrométrie de masse, la protéine S12 du ribosome d'une souche sauvage d'*E. coli* et confirment la présence du groupement thiométhyle. La même expérience réalisée sur un mutant d'*E. coli* dont le gène *yliG* a été inactivé (*E. coli yliG*⁻) montre que la protéine S12 ribosomale n'est plus thiométhylée. La complémentation *in vivo* de cette souche avec un plasmide contenant le gène *yliG* permet de restaurer partiellement la thiométhylation de la protéine ribosomale S12. Sur la base de cette expérience, le gène *yliG* ainsi que la protéine codée par ce gène ont été renommés respectivement *rimO* et RimO pour Ribosomale modification O (Fig I) Enfin, dans cet article, l'auteur propose une classification des thiométhyltransférases bactériennes basée sur une analyse bioinformatique.

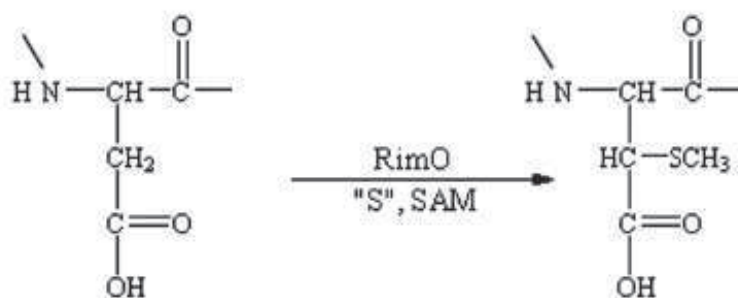


Figure I : Thiométhylation du résidu D89 de la protéine ribosomale S12 catalysée par la protéine RimO.

Nous avons dans un premier temps entrepris de réactualiser cette analyse bioinformatique en compilant les protéines RimO répertoriées dans la base de données Uniprot. L'enzyme RimO de *T. maritima* a ensuite été caractérisée biochimiquement et spectroscopiquement (UV-Visible, RPE et Mössbauer). Dans un second temps, nous avons

* en fait 89, en tenant compte de la méthionine initiale

mis en place un test d'activité enzymatique *in vitro* de la protéine RimO. Enfin, nous avons fait une étude structurale de l'apo-protéine à partir de sa structure tridimensionnelle obtenue par cristallographie aux rayons X.

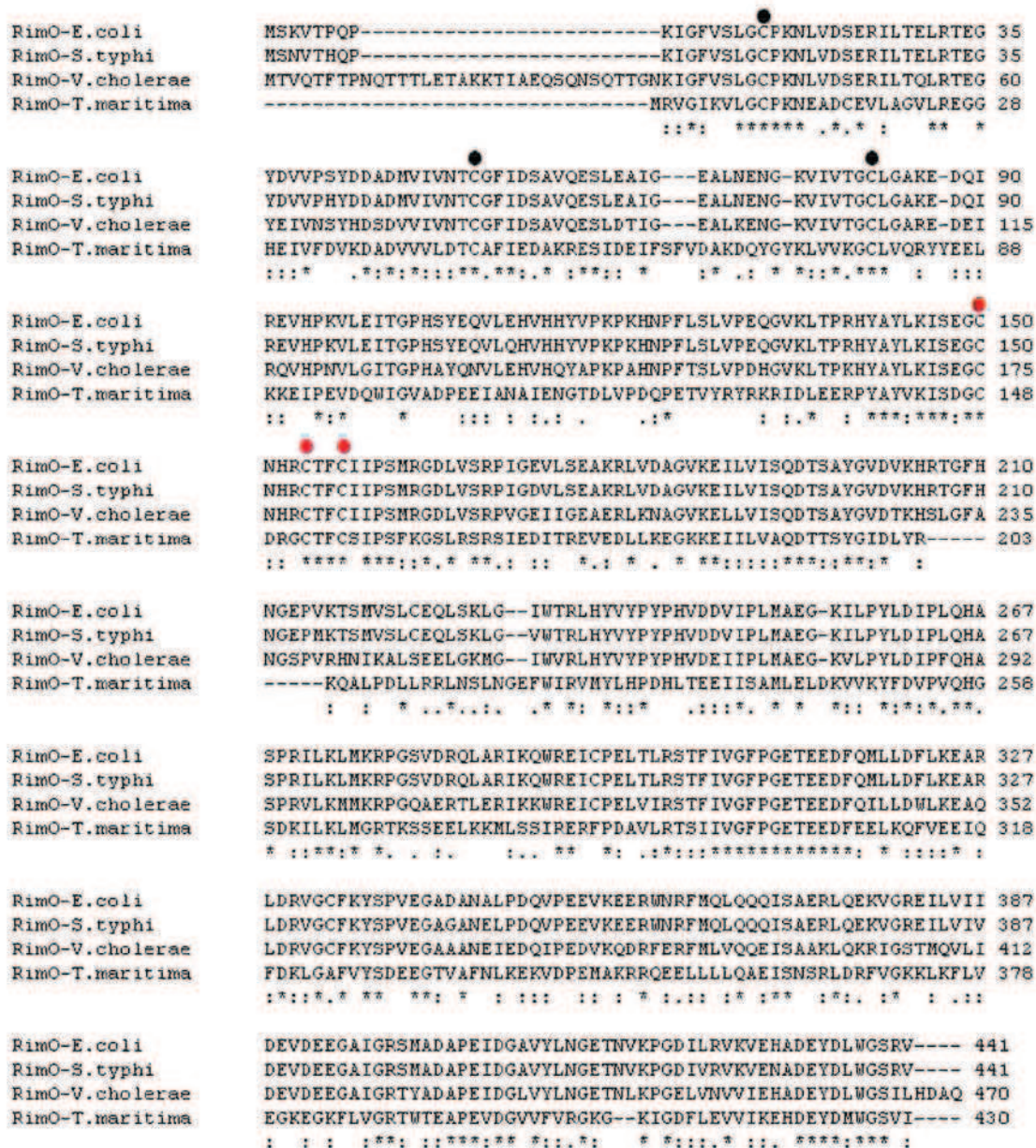
I-1) Analyse bioinformatique de la MTTase RimO.

L'analyse phylogénétique des séquences de protéines RimO présentes dans la base de données Uniprot, examinées et annotées automatiquement, montre qu'elles ne sont présentes que chez les Bactéries. La même analyse effectuée avec la protéine ribosomale S12 révèle que toutes les séquences de S12 bactériennes présentent un aspartate strictement conservé correspondant dans le cas de la protéine ribosomale S12 d'*E. coli* et de *T. maritima* à la position 89.

L'alignement de séquence présenté ci-dessous (Fig I-1) a été généré par le logiciel ClustalW avec les séquences protéiques de RimO provenant des organismes suivants : *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Thermotoga maritima* et *Salmonella typhimurium*. Cet alignement permet de montrer les acides aminés strictement conservés entre ces différentes séquences de protéines RimO. Tout d'abord, la présence des trois cystéines du motif CX₃CX₂C appelé Radical-SAM (ronds rouge, Fig I-1) impliquées dans la coordination d'un centre [4Fe-4S]^{2+/+}. Sous forme réduite, ce centre permet la réductolyse de la SAM qui se traduit par la formation du radical 5'-desoxyadénosyle (Ado[•]) responsable de l'activation du substrat. Au cours de ce manuscrit, le motif CX₃CX₂C sera nommé : motif Radical-SAM ou site Radical-SAM.

Trois autres cystéines strictement conservées sont présentes dans la partie N-terminale des MTTases mais distantes les unes des autres dans la structure primaire (ronds noirs, Fig I-1). Dans le cas de MiaB, ces trois cystéines permettent la fixation d'un deuxième centre [4Fe-4S]^{2+/+} (71). Toutes les enzymes impliquées dans l'insertion du soufre dans des substrats par voie radicalaire possèdent un deuxième centre que ce soit un centre [2Fe-2S]^{2+/+} dans le cas de la Biotine Synthase (43), ou un centre [4Fe-4S]^{2+/+} dans le cas de la Lipoate Synthase (59). Il a été proposé que ce centre Fe-S présent dans le domaine N-terminal de ces enzymes soit le donneur de soufre au cours de la réaction (voir Introduction).

Afin de pouvoir proposer un mécanisme enzymatique sur le fonctionnement de la protéine RimO, il semble indispensable (i), d'établir le nombre de centres [4Fe-4S] présents



- 77 -

I-2) Obtention de la thiométhyltransférase RimO de *T. maritima*.

I-2-1) Surexpression de RimO de *T. maritima* dans la souche *E. coli* BL21 Codonplus® (DE3)-RIL.

La surexpression hétérologue de la protéine RimO est faite dans le milieu LB avec les cellules *E. coli* BL21 Codonplus® (DE3)-RIL recombinantes (M&M III-1-1), possédant le plasmide *rimO*-Tm-pET3b. Les clones recombinants sont sélectionnés sur boîte de Pétri LB contenant de l'ampicilline et du chloramphénicol. La surproduction de la protéine RimO est induite par ajout de 100 µg d'IPTG lorsque la densité optique à 600 nm de la culture atteint 0,6. La culture est ensuite poursuivie pendant 2 h à 30°C (M&M III-1-1).

Trois expériences ont été réalisées en parallèle. Dans la première, des cellules *E. coli* BL21 Codonplus® (DE3)-RIL ont été cultivées en milieu LB. Dans la deuxième expérience des cellules *E. coli* BL21 Codonplus® (DE3)-RIL transformées avec le plasmide *rimO*-Tm-pET3b ont été mises en culture dans les mêmes conditions. Dans la troisième expérience, ces mêmes cellules *E. coli* BL21 Codonplus® (DE3)-RIL transformées avec le plasmide *rimO*-Tm-pET3b ont été cultivées puis 100 µg d'IPTG stérile ont été ajoutés lorsque la densité optique à 600 nm a atteint 0,6 (Fig I-2-1). Des cellules issues de chacune de ces cultures ont été prélevées (100 µL) puis analysées par SDS-PAGE 12% (Fig I-2-1). La surexpression hétérologue de la protéine RimO est observée en (2) dans les cellules BL21 Codonplus® (DE3)-RIL transformées avec le plasmide *rimO*-Tm-pET3b incubées en présence d'IPTG contrairement aux deux autres expériences contrôles en (1) et (3). La masse de la protéine surexprimée en (2) est en accord avec la masse moléculaire théorique de la protéine RimO (49 222 Da) (Fig I-2-1).

L'ensemble du protocole de purification de la protéine RimO est réalisé en milieu aérobie ce qui entraîne une dégradation partielle des centres [4Fe-4S] sensibles à l'oxygène. Les cellules sont lysées par sonication et les extraits solubles obtenus par ultracentrifugation (M&M III-3). Cette surexpression hétérologue de la protéine RimO de *T. maritima* dans l'organisme mésophile *E. coli* permet d'éliminer facilement par chauffage la majorité des protéines d'*E. coli* sensibles à la chaleur. Après chauffage, la solution protéique est centrifugée (20 min, 10000 rpm) et le culot éliminé. Les protéines contenues dans le

surnageant sont précipitées en saturant à 65% la solution avec du sulfate d'ammonium. Après centrifugation (10000 rpm, 20 min) le culot protéique est congelé à -80°C .

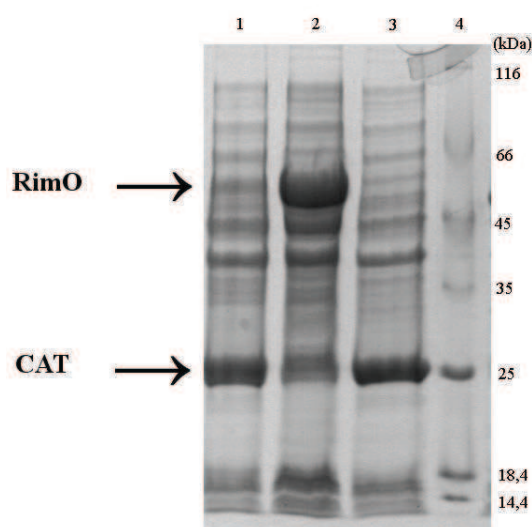


Figure I-2-1 : Vérification de la surexpression de la protéine RimO dans la souche *E. coli* BL21 Codonplus® (DE3)-RIL par analyse sur gel SDS-PAGE 12%. 1: Cellules contenant le plasmide rimO-pET3b; 2: Cellules contenant le plasmide rimO-pET3b en présence de 100µg d'IPTG (2h, 30°C) ; 3: Cellules *E. coli* BL21 Codonplus® (DE3)-RIL; 4: marqueur de masse moléculaire, CAT : Chloramphénicol Acétyltransférase.

I-2-2) Purification de l'enzyme RimO de *T. maritima*.

I-2-2-1) Colonne Butyl-Sépharose.

Le culot protéique est décongelé et dissous dans le tampon A, Tris-Cl 50 mM pH 8, Sulfate d'Ammonium 1 M. Après centrifugation (10000 rpm, 20 min.), la solution protéique est passée sur filtre (0,45 µm), puis chargée sur une colonne hydrophobe Butyl-Sépharose préalablement équilibrée avec le tampon A (M&M III-3-3). Après une étape de lavage avec 4 volumes colonne de ce même tampon, un gradient de 100% à 0% de sulfate d'ammonium est réalisé vers le tampon B Tris-Cl 50 mM pH 8, NaCl 50 mM (Fig I-2-2-1).

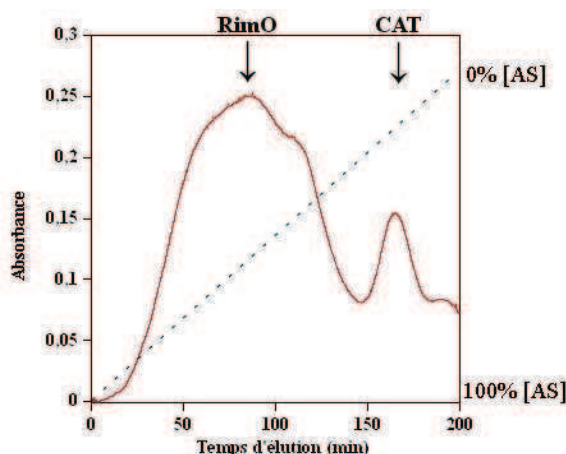


Figure I-2-2-1 : Profil d'élution FPLC de la protéine RimO sur colonne Butyl-Sépharose. La solution protéique est chargée sur la colonne et lavée en mode manuel avec le tampon A (Tris-Cl 50 mM, pH 8, sulfate d'ammonium 1 M). Un gradient de 0 à 100 % de tampon B Tris-Cl 50 mM pH 8, NaCl 50 mM à 1 mL/min (ligne en pointillé) permet l'élution de la protéine entre 10 et 30 % de sulfate d'ammonium. CAT : Chloramphénicol Acétyltransférase.

I-2-2-2) Gel SDS-PAGE 12% après Butyl-Sépharose.

Au début du gradient, des fractions de 4 mL sont collectées et analysées sur gel SDS-PAGE 12 % (Fig I-2-2-2-A). Les fractions déposées dans les puits 1, 2, 3, 4, 5 et 6 contiennent la protéine RimO pure à 95 % et sont collectées (Fraction 1-6) puis concentrées et le sulfate d'ammonium éliminé par lavage avec le tampon B par des cycles de dilution et concentration sur microconcentrateur. Avant congélation la pureté de la protéine est évaluée sur gel SDS-PAGE 12% (Fig I-2-2-2-B).

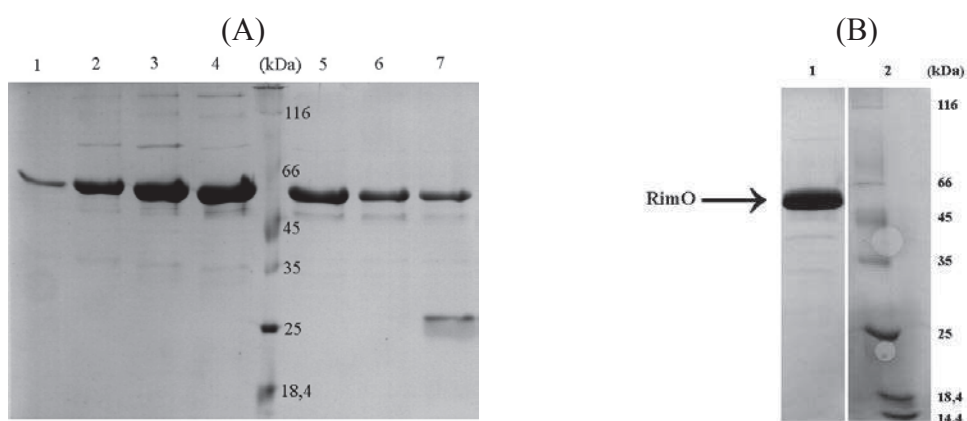


Figure I-2-2-2 : Purification de la protéine RimO sur colonne hydrophobe Butyl-Sépharose (A) puis lavée et concentrée (B). En (A) (1): Fractions de 20 à 24 mL ; (2): Fraction de 40 à 44 mL ; (3): Fraction de 60 à 64 mL ; (4): Fraction de 80 à 84 mL ; Marqueur de masse moléculaire ; (5) : Fraction de 100 à 104mL ; (6) : Fraction de 120 à 124 mL ; (7) : Fraction de 160 à 164mL. En (B) la protéine RimO pure à 95 %.

Les conditions expérimentales entraînant la dégradation des centres [Fe-S], il est préférable de réaliser un traitement chimique de l'enzyme RimO avec un excès de dithionite et d'EDTA (M&M III-4) afin de préparer une solution homogène d'apo-RimO. Ce traitement de la protéine RimO est réalisé en absence d'oxygène (Boîte à gants, N₂) et permet de réduire le fer présent dans la protéine puis de le chélater par de l'EDTA.

I-2-2-3) Profil d'élution FPLC de l'apo-RimO sur colonne Superdex75.

Après deux heures d'incubation à 17°C, la protéine est purifiée sur colonne Superdex-75 (analytique ou préparative selon la quantité de protéine). Le tampon utilisé lors de la préparation de l'apoprotéine RimO est le tampon Tris-Cl 50 mM pH : 8, NaCl 50 mM et 5 mM de DTT (Fig I-2-2-3-A). La pureté de la protéine RimO est évaluée sur gel SDS-PAGE.

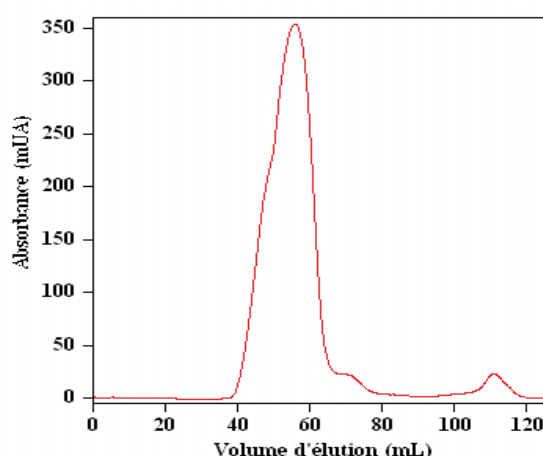


Figure I-2-2-3-A : Profil d'élution FPLC de l'apoprotéine RimO sur colonne Superdex75 préparative. La solution protéique RimO (25 mg, 10 mL) contenant du dithionite (2 mM) et l'EDTA (10 mM) est injectée sur une colonne Superdex75 préparative préalablement équilibrée dans le tampon Tris-Cl 50 mM pH8, NaCl 50 mM, 5mM de DTT. Cette purification a été réalisée avec un débit de 1mL/min sur un système de purification Akta Purifier.

Afin de vérifier la masse de la protéine, l'apo-RimO a été analysée par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Fig I-2-2-3-B). Le spectre de masse montre principalement deux pics correspondant aux états mono et di protoné ($m/z = (M+H)/H = 49126$, $m/z = (M+2H)/2H = 24563$) en accord avec les masses théoriques de ces deux espèces ($m/z = (M+H)/H = 49222$ et $m/z = (M+2H)/2H = 24612$).

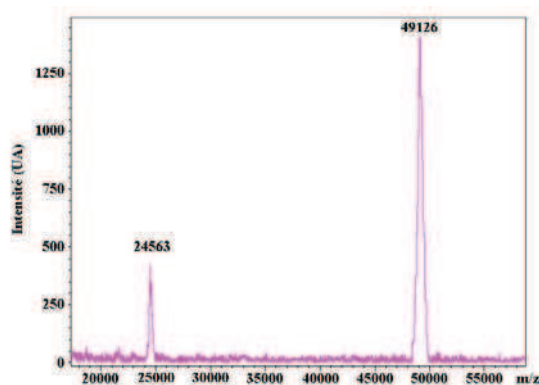


Figure I-2-2-3-B : Spectre MALDI-TOF de la protéine RimO pure à 95%. Deux états de protonation de la protéine RimO sont visibles ($m/z = (M+H)/H = 49126$ et $m/z = (M+2H)/2H = 24563$). Les masses théoriques sont les suivantes : ($m/z = (M+H)/H = 49222$ et $m/z = (M+2H)/2H = 24612$). La différence de masse observée est de 96 Da, compatible avec la précision affichée de l'appareillage utilisé (± 100 Da).

I-3) Obtention de la thiométhyltransférase RimO-6H de *T. maritima*.

I-3-1) Surexpression de la protéine RimO-6H de *T. maritima*.

La surexpression de la protéine RimO-6H de *T. maritima* contenant l'étiquette 6 histidines (-6H) est réalisée dans la souche *E. coli* BL21 Codonplus® (DE3)-RIL dans les mêmes conditions expérimentales que celles décrites précédemment. La figure I-3-1 montre l'analyse par SDS-PAGE 12% des extraits protéiques solubles en (1) et des cellules transformées avec le plasmide *rimO*-Tm-pET21d puis cultivées en présence d'IPTG en (2). La surexpression hétérologue de RimO-6H est visible en (2) et la masse mesurée estimée par les marqueurs de poids moléculaire est en accord avec la masse moléculaire théorique de RimO-6H (50 287 Da).

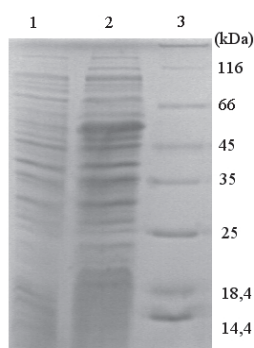


Figure I-3-1- : Surexpression de la protéine RimO-6H dans la souche *E. coli* BL21 Codonplus® (DE3)-RIL analysée sur gel SDS-PAGE à 12%. (1): Cellules *E. coli* BL21 Codonplus® (DE3)-RIL; (2): *E. coli* BL21 Codonplus® (DE3)-RIL avec le plasmide *rimO*-Tm-pET21d en présence de 100µg d'IPTG; (3): marqueurs de masse moléculaire.

I-3-2) Préparation de la protéine RimO-6H de *T. maritima*.

Après préparation des extraits solubles, la protéine RimO-6H est purifiée sur colonne Ni-NTA (Ni-NTA Superflow, Qiagen) (M&M III-3-4). L'apoprotéine est préparée en présence de dithionite et d'EDTA (M&M III-4) puis les composés de faible poids moléculaire éliminés lors d'une dernière étape de chromatographie sur colonne Superdex-75. La pureté de la protéine est évaluée à 98% par SDS-PAGE 12% (Fig I-3-2).

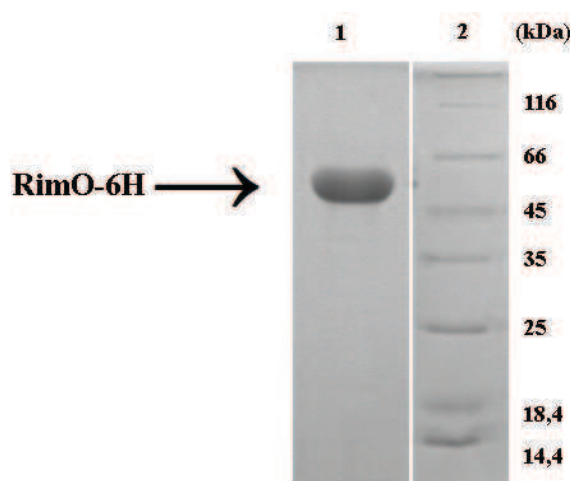


Figure I-3-2 : Gel SDS-PAGE 12% de RimO-6H après colonne Ni-NTA. 1: RimO-6H; 2: marqueurs de masse moléculaire.

I-4) Etude biochimique de RimO.

I-4-1) Reconstitution des centres [Fe-S] de la protéine RimO.

L'holoprotéine RimO est préparée en boîte à gants par reconstitution des centres [Fe-S] en présence d'un excès de DTT, de L-cystéine, de Fe^{2+} et d'une quantité catalytique de cystéine désulfurase (CSDA) d'*Escherichia coli* (M&M III-5-1). Les conditions expérimentales sont illustrées par l'exemple type suivant: Dans un volume final de 2.5 mL, on mélange 200 nmoles d'apo-RimO (550 μL à 364 μM), 2 μmoles (10 excès molaires) de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ par rapport à la protéine et 3 μmoles de L-cystéine (15 excès molaires). Les solutions de cystéine, de DTT et de Fer sont préparées en boîte à gants avant chaque expérience. Généralement, des quantités catalytiques d'enzyme CSDA sont utilisées et la concentration optimale se situe entre 1 et 2 μM de CSDA selon la quantité de protéine présente lors de l'expérience (M&M III-5-1).

I-4-2) Cinétique de reconstitution suivie par spectroscopie UV-Visible.

La reconstitution des centres [Fe-S] est suivie par spectroscopie UV-visible par enregistrements successifs de spectres entre 250 nm et 850 nm depuis l'intérieur de la boîte à gants dans une cuve de 1 mm de trajet optique. Le suivi de la cinétique à 400 nm permet de visualiser la reconstitution des centres [Fe-S] (Fig I-4-2). La fin de la reconstitution se traduit par l'apparition d'un plateau. La protéine est ensuite purifiée par filtration sur gel (colonne NAP-25) dans le tampon Tris-Cl 50 mM pH : 8, NaCl 50 mM. Après concentration de la solution protéique par ultrafiltration sur microconcentrateurs (Vivaspin 500, 30 kDa), un spectre UV-Visible de l'holoenzyme RimO est enregistré (Fig I-5-1).

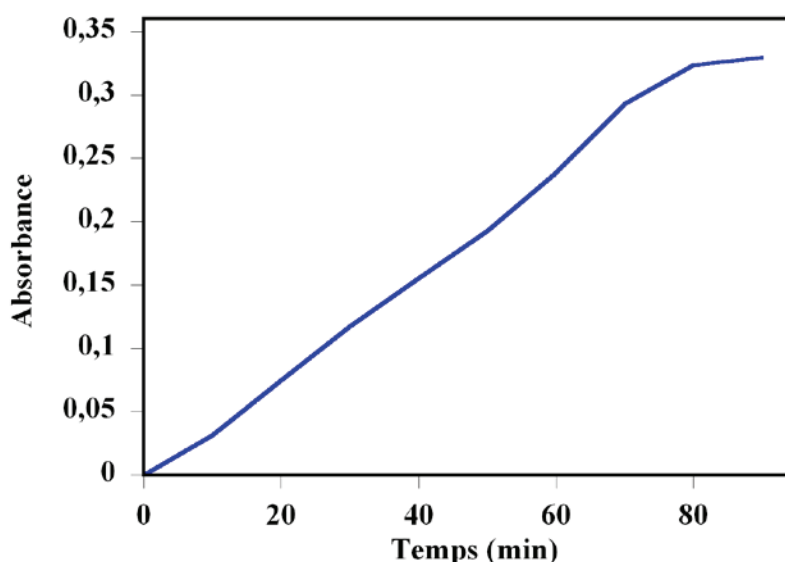


Figure I-4-2: Cinétique de reconstitution des centres [Fe-S] à 400 nm de la protéine RimO. Lorsque la cinétique à 400 nm atteint un plateau, la réaction est arrêtée par le transfert de la solution protéique sur colonne NAP-25 préalablement équilibrée avec le tampon Tris-Cl 50 mM pH8, NaCl 50 mM.

I-4-3) Détermination des coefficients d'extinction molaire de l'apo et de l'holo-RimO.

Lors de purification de la protéine RimO la quantité de protéine est évaluée par le dosage de Bradford. Cependant, la suite des expériences (tests d'activité, spectroscopies) nécessite de déterminer des concentrations de façon précise. La méthode consiste à mesurer le coefficient d'extinction molaire de RimO. Les coefficients d'extinction molaire ont été calculés à partir de la concentration exacte de la protéine obtenue par dosage des acides

aminés (M&M III-7). Le coefficient calculé d'extinction molaire de l'apo-RimO est de $50 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ alors que celui de l'holo-RimO est de $100 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Le coefficient d'extinction molaire expérimental à 400 nm pour l'holo-RimO ($35 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) est en accord avec la présence de deux centres [4Fe-4S] (Tableau I-4-3).

Protéine	pI	Masse moléculaire (Da)	Apo $\epsilon_{280}^{\text{théo}}$ ($\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)	Apo $\epsilon_{280}^{\text{exp}}$ ($\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)	Holo $\epsilon_{280}^{\text{exp}}$ ($\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)	Holo $\epsilon_{400}^{\text{exp}}$ ($\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)
RimO	4,87	49 222	43 235	50 000	100 000	35 000

Tableau I-4-3 : Caractéristiques physicochimiques de la protéine RimO *T. maritima*. Les caractéristiques physicochimiques théoriques données par le logiciel ProtParam (pI : Point isoélectrique, masse moléculaire et $\epsilon_{280 \text{ nm}}$ théorique) et expérimentaux avec les coefficients molaires pour l'apoprotéine $\epsilon_{280}^{\text{apo}}$, l'holoprotéine $\epsilon_{280}^{\text{holo}}$ et l'holoprotéine $\epsilon_{420 \text{ nm}}^{\text{holo}}$.

I-4-4) Dosage du fer et du soufre présent dans l'holo-RimO.

Les dosages du fer par la technique de Fish (M&M III-8) et du soufre par la technique de Beinert (M&M III-9) ont été réalisés pour la solution d'holo-RimO. L'ensemble des résultats obtenus montre que la protéine contient en moyenne $7 \pm 0,5$ atomes de fer et $8 \pm 0,8$ atomes de soufre par monomère. Il faut noter que le nombre d'atomes de soufre par monomère trouvé par la méthode de Beinert est toujours supérieur au nombre d'atomes de fer alors que c'est plutôt l'inverse pour la plupart des protéines [Fe-S] étudiées au laboratoire. Dans le chapitre II, les préparations de d'holo-RimO ont été modifiées et les résultats obtenus pour le dosage du soufre sont différents.

I-5) Caractérisation spectroscopique.

La caractérisation spectroscopique UV-visible, RPE et Mössbauer de l'holo-RimO a été réalisée sur la même préparation afin de pouvoir comparer les résultats donnés par chacune des techniques. Pour la spectroscopie Mössbauer, la reconstitution *in vitro* des centres [Fe-S] a été réalisée avec une solution de $^{57}\text{Fe}^{\text{II}}$ (M&M III-5-2). Des échantillons de RimO dont les centres [Fe-S] sont reconstitués en présence de fer naturel ont également été étudiés par spectroscopie UV-visible et RPE. L'ensemble de l'étude spectroscopique de l'holo-RimO a été réalisé en collaboration avec l'équipe Physicochimie des Métaux en Biologie (PMB) du LCBM.

I-5-1) Spectroscopie UV-Visible de l'holo-RimO.

Après reconstitution des centres [$^{57}\text{Fe-S}$] en boîte à gants (M&M III-5-2), un spectre de la protéine RimO est enregistré entre 250 nm et 850 nm dans une cuve de 1 cm de trajet optique. Dans l'exemple présenté ci-dessous (Fig I-5-1), la concentration est déterminée par utilisation du coefficient d'extinction molaire de l'holoprotéine RimO $^{\text{Holo}}\epsilon_{280} = 100 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (7,86 μM) et $^{\text{Holo}}\epsilon_{400} = 35 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (6,49 μM). Pour cette préparation d'holo-RimO, le rapport $\text{Abs}_{400}/\text{Abs}_{280}$ égal à 0,29 permet d'estimer à 2 le nombre de centres $[\text{4Fe-4S}]$ par monomère. L'ajout de 8 excès de dithionite entraîne la réduction de centre $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ en $[\text{4Fe-4S}]^{+}$ (diminution de l'absorbance à 400 nm, en rouge). L'absorption à 314 nm est due au dithionite (Fig I-5-1).

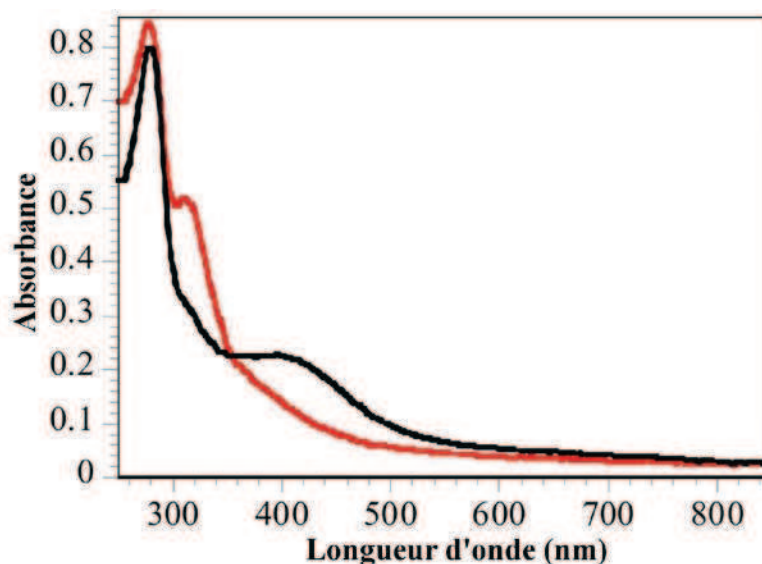


Figure I-5-1: Spectre UV-Visible de l'holo-RimO. L'holo-RimO possédant des centres $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ reconstitués *in vitro* avec du ^{57}Fe (noir) et la même solution après 20 minutes de réduction avec 8 excès de dithionite (rouge).

I-5-2) Spectroscopie RPE.

Alors que les centres $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ sont diamagnétiques, (Fig I-5-1) les centres $[4\text{Fe-4S}]^+$ obtenus après réduction avec le dithionite sont paramagnétiques et donc observables par spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE).

I-5-2-1) Conditions d'enregistrement des spectres.

La protéine RimO réduite a été analysée par spectroscopie RPE en bande X. Les spectres ont été enregistrés dans des conditions de non saturation du signal. Les propriétés spectroscopiques de ce signal en fonction de la puissance et de la température, montrent que ce système suit une loi de Curie. Des spectres à $g \approx 2$ ont été enregistrés dans des conditions non saturantes entre 6K et 20K, puis corrigés pour être comparés avec un spectre enregistré à 40 dB (20 μW , 2 scans, gain = 10^4). Les différentes études par RPE réalisées sur l'holo-RimO montrent que, suivant les préparations, la quantification du signal par rapport à un étalon externe de Cu-EDTA varie de 0,6 à 0,9 spins par monomère d'holo-RimO. Cette quantification ne prend pas en compte le signal observé à bas champ (Fig I-5-2-3).

I-5-2-2) Spectre RPE de RimO à champ fort.

Le signal enregistré est représenté en rouge (Fig I-5-2-2). Ce signal partiellement rhombique à $g \approx 2$ est associé à la présence d'un centre $[4\text{Fe-4S}]^+$ à l'état de spin $S = 1/2$. Cependant, la simulation de ce signal en bleu (Fig I-5-2-2-A) avec un seul jeu de paramètres ne permet pas de reproduire correctement le g_{\perp} . Par contre, le signal enregistré en rouge, peut être simulé par deux jeux de paramètres de centre $[4\text{Fe-4S}]^+$ légèrement différents de spin $S = 1/2$ (ratio 51 : 49) en utilisant une fonction lorentzienne (1^{er} centre $[4\text{Fe-4S}]^+$: $g_{1x} = 1.902$, $g_{1y} = 1.930$, $g_{1z} = 2.030$, $w_{1x} = 2.7$ mT, $w_{1y} = 3.4$ mT, et 2^{eme} centre $[4\text{Fe-4S}]^+$ $w_{1z} = 2.2$ mT, $g_{2x} = 1.879$, $g_{2y} = 1.940$, $g_{2z} = 2.042$, $w_{2x} = 3.4$ mT, $w_{2y} = 1.1$ mT et $w_{2z} = 3.1$ mT avec w : demi largeur à mi-hauteur maximale) (bleu, Fig I-5-2-2-B). Le spectre de l'holo-RimO reconstituée avec du ^{57}Fe (Fig I-5-2-2-C), présente un élargissement des différentes composantes du signal en raison de l'interaction hyperfine entre le spin nucléaire du ^{57}Fe ($S = 1/2$) et le centre $[\text{Fe-S}]$. Mis à part la largeur des raies et un ratio légèrement différent (59:41), le signal peut être simulé avec les mêmes jeux de paramètres que précédemment. En résumé, cette analyse RPE est en accord avec la présence de deux centres $[4\text{Fe-4S}]^+$ par monomère d'holo-RimO.

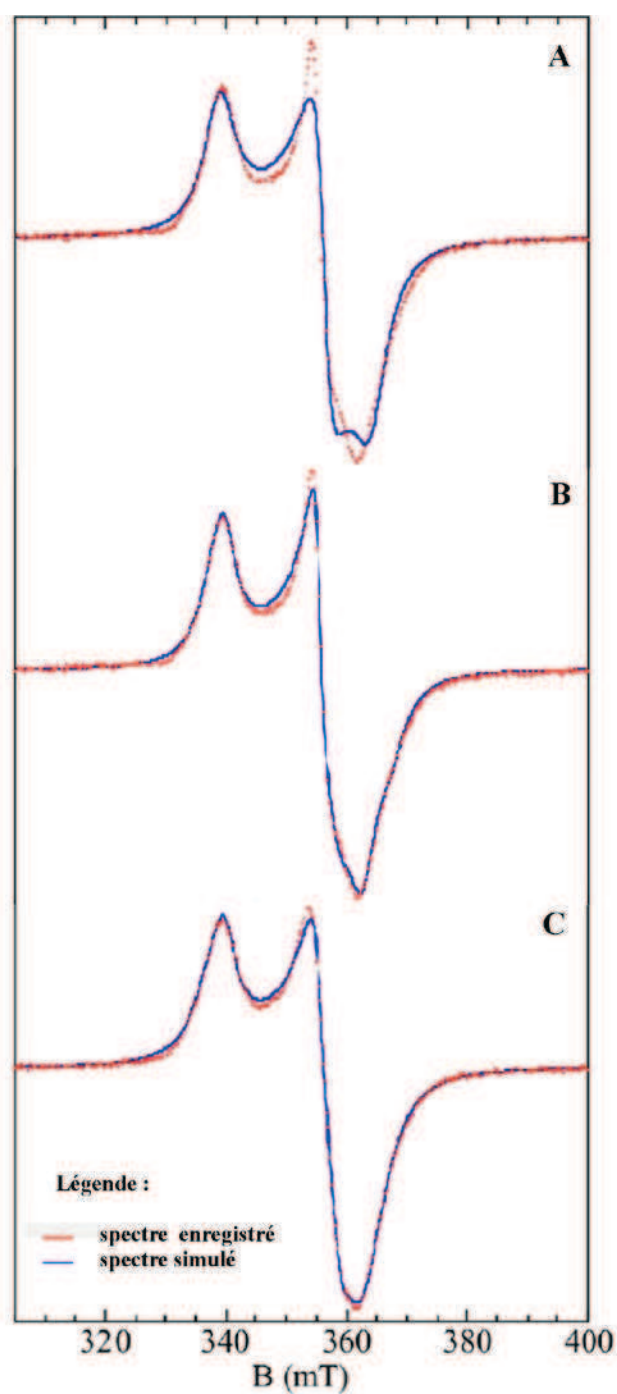


Figure I-5-2-2 : Spectres RPE en bande X à haut champ de l'holo-RimO. En rouge, le spectre de l'holo-RimO (200 μ L, 144 μ M), dont les centres $[4\text{Fe-4S}]^+$ ont été reconstitués *in vitro* en présence de Fe^{II} naturel à partir de sel de Mohr puis réduit en présence de 8 excès de dithionite. Les spectres ont été enregistrés en conditions de non saturation du signal (Puissance : 0,63 mW, Fréquence : 9,65 GHz) pour les spectres A et B et Puissance : 2.52 mW, Fréquence : 9.65 GHz pour l'échantillon d'holo-RimO contenant du ^{57}Fe , spectre C).

I-5-2-3) Spectre RPE de RimO à champ faible.

Le spectre à bas champ (100 mT - 260 mT) enregistré à 4,2 K (Fig I-5-2-3) correspond à un état fondamental provenant d'un ou de deux centres $[4\text{Fe-4S}]^+$. Dans le cas de l'holo-MiaB, ce signal a été attribué à un état de spin $S = 3/2$ (71).

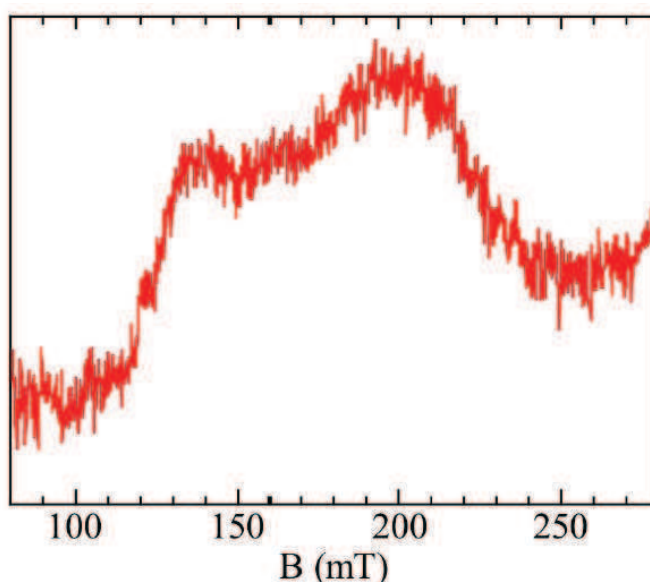


Figure I-5-2-3 : Spectre RPE en bande X à bas champ de l'holo-RimO. Les centres $[4\text{Fe-4S}]^+$ de l'holo-RimO (144 μM) ont été reconstitués *in vitro* en présence de ^{57}Fe puis réduit par 8 excès de dithionite ($V_f = 200 \mu\text{L}$). Le spectre a été enregistré dans des conditions non saturantes à 4.3 K avec $P = 50 \text{ mW}$ et $F = 9.65 \text{ GHz}$.

I-5-2-4) Spectre RPE de RimO en présence de SAM.

Sur la préparation d'holo-RimO possédant deux centres $[4\text{Fe-4S}]^+$ reconstitués avec du ^{57}Fe , de la SAM a été ajoutée afin d'étudier l'effet de ce cofacteur sur le signal RPE. Le signal à $g \approx 2$ observé est différent de celui en absence de la SAM (Fig I-5-2-4) avec une diminution de l'amplitude du g_{xy} par rapport au g_z . Cette modification montre que le cofacteur est suffisamment proche d'un des centres pour induire une perturbation du signal RPE. Cependant, l'analyse par RPE bidimensionnelle (M&M IV-2) permet d'exclure la fixation de la SAM sur un centre $[4\text{Fe-4S}]^+$. On peut donc conclure que la SAM est proche du site actif sans toutefois être fixée sur le centre $[4\text{Fe-4S}]^+$ du site Radical-SAM.

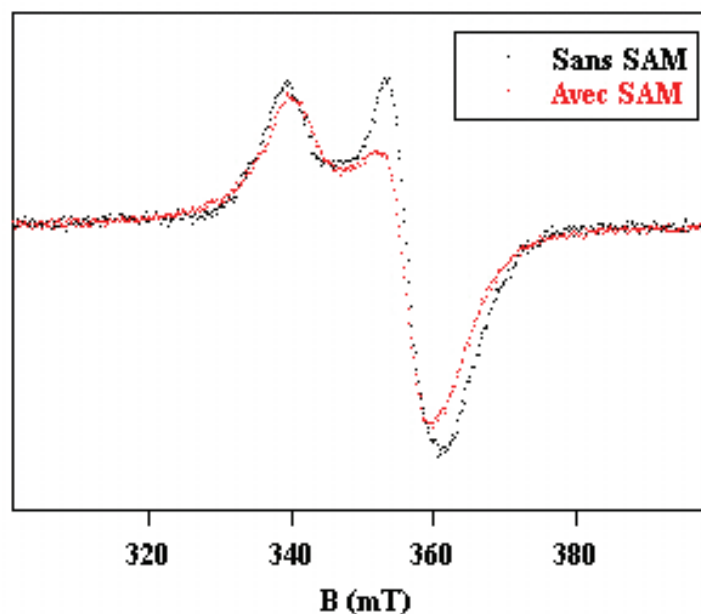


Figure I-5-2-4 : Spectre de l'holo-RimO possédant deux centres $[4\text{Fe-4S}]^+$ en présence de SAM. Les centres $[4\text{Fe-4S}]^+$ de l'holo-RimO (144 μM) ont été reconstitués *in vitro* en présence de ^{57}Fe , réduits avec 8 excès de dithionite puis 3,2 mM de SAM ont été ajoutés ($V_f = 200 \mu\text{L}$). Le spectre présenté ci-dessus a été enregistré dans les conditions expérimentales suivantes (10 K, Puissance 37 dB, Fréquence 9.65 GHz).

I-5-3) Spectroscopie Mössbauer.

I-5-3-1) Spectre Mössbauer de RimO.

Parallèlement à la spectroscopie RPE en bande X, des échantillons issus de la même préparation ont été analysés par spectroscopie Mössbauer. Le spectre Mössbauer brut obtenu pour l'échantillon d'holo-RimO, après reconstitution *in vitro* des centres $[\text{Fe-S}]$, est présenté ci-dessous en noir (Fig I-5-3-1-A). Le fer ferreux présent dans l'échantillon est visible (vert, Fig I-5-3-1-A) et a été modélisé par deux jeux de paramètres dont l'intensité du premier correspond à 8 % du fer total de l'échantillon ($\delta = 1,12 \text{ mm/s}$, $\Delta Q = 2,88 \text{ mm/s}$) et celle du deuxième à 4 % du fer total de l'échantillon ($\delta = 1,04 \text{ mm/s}$, $\Delta Q = 3,76 \text{ mm/s}$).

L'absorption du fer ferreux est soustraite sur le spectre d'absorption noir présenté en B (Fig I-5-3-1 B). La majorité du signal ne peut être simulée qu'avec un centre $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ dit « typique » possédant deux paires $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$ délocalisés aussi notés $\text{Fe}^{2,5+}\text{Fe}^{2,5+}$ ($\delta = 0,45 \text{ mm/s}$, $\Delta Q = 1,04 \text{ mm/s}$) dont l'intensité représente 56% du signal (violet, Fig I-5-3-1-B). Un deuxième centre dit « atypique » représente 32% du signal observé et possède une paire de valence $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$ délocalisée ($\delta = 0,48 \text{ mm/s}$, $\Delta Q = 1,15 \text{ mm/s}$) (Ligne bleu, Fig I-5-3-1-B) et

une paire de valence $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$ partiellement localisée (Tiret bleu, Fig I-5-3-1-B) avec un fer à caractère plutôt ferreux ($\delta = 0,60 \text{ mm/s}$, $\Delta Q = 2,07 \text{ mm/s}$) et un autre fer (Pointillé bleu, Fig I-5-3-1-B) à caractère plutôt ferrique ($\delta = 0,3 \text{ mm/s}$, $\Delta Q = 0,9 \text{ mm/s}$).

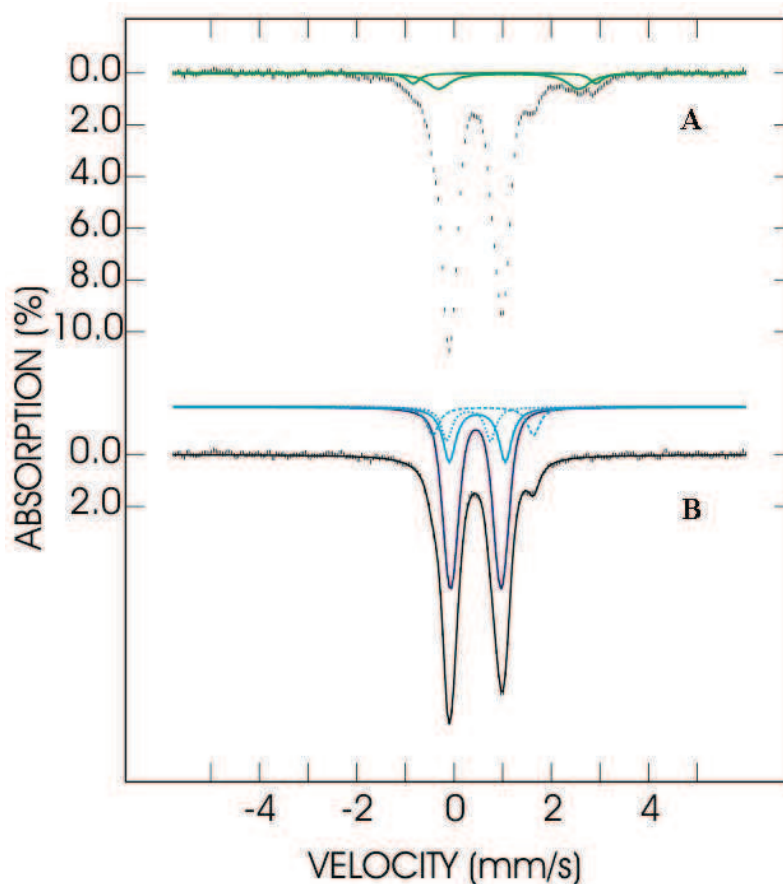


Figure I-5-3-1 : Spectroscopie Mössbauer de l'holo-RimO après reconstitution des centres $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ *in vitro* avec du ^{57}Fe en boîte à gants. L'holoenzyme RimO est congelée en boîte à gants dans une cellule Mössbauer ($V_f = 450 \mu\text{L}$ à $288 \mu\text{M}$). (A) : spectre d'absorption brut en noir accompagné de la simulation des deux sites Fe^{II} en vert. (B) : spectre brut en noir après soustraction du $\text{Fe}(\text{II})$ accompagné des simulations des paires $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$ des deux centres $[\text{4Fe4S}]^{2+}$. Le centre $[\text{4Fe4S}]^{2+}$ « typique » est en violet et le centre « atypique » en bleu.

L'ensemble des résultats obtenus par les méthodes analytiques et par spectroscopie UV-visible, RPE et Mössbauer permet de conclure sans ambiguïté à la présence de deux centres $[\text{4Fe-4S}]$ par monomère de RimO.

I-5-3-2) Spectre Mössbauer de RimO en présence de SAM.

L'échantillon de l'holo-RimO reconstitué avec du ^{57}Fe en présence de la SAM analysé précédemment en spectroscopie RPE a été étudié en spectroscopie Mössbauer à 4,2 K. La Figure I-5-3-2 montre les enregistrements de cet échantillon sans champ appliqué (Fig I-5-3-2-A), avec 50 mT de champ perpendiculaire (Fig I-5-3-2-B) et 1T (Fig I-5-3-2-C) ou 7T de champ parallèle (Fig I-5-3-2-D).

L'ensemble de ces enregistrements (Fig I-5-3-2) montre que 32% du fer présent dans l'échantillon se trouve dans le centre $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ typique ($\delta = 0,42 \text{ mm/s}$, $\Delta E_Q = 0,94 \text{ mm/s}$) (violet, Fig I-5-3-2), 33% du fer réside dans le centre $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ atypique ($\delta = 0,47 \text{ mm/s}$, $\Delta E_Q = 1,19 \text{ mm/s}$ et $\delta = 0,68 \text{ mm/s}$, $\Delta E_Q = 1,78 \text{ mm/s}$) (bleu, Fig I-5-3-2), 16% du fer apparaît sous forme de $[\text{3Fe-4S}]^0 \text{ S}=2$ ($\delta = 0,50 \text{ mm/s}$, $\Delta E_Q = 1,14 \text{ mm/s}$ et $\delta = 0,34 \text{ mm/s}$, $\Delta E_Q = 0,48 \text{ mm/s}$) (mauve, Fig I-5-3-2), et 19% sous forme de fer ferreux .

En comparant les échantillons avec et sans SAM, on constate que la proportion de centre $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ atypique reste identique. A l'inverse, le centre typique passe d'une proportion de 56% à 32% lors de l'ajout de SAM soit une diminution de 24%. Dans le même temps, on observe une augmentation de 7% de fer ferreux avec l'apparition de 16% de centre $[\text{3Fe-4S}]^0$ soit 23% du fer total de l'échantillon.

Cette expérience permet de dire que le centre $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ typique se dégrade en présence de SAM. Si l'on ajoute les 7% de fer ferreux, les 16% de fer dans le centre $[\text{3Fe-4S}]^0$ et les 32% de fer présent dans le centre $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ typique, on obtient un total de 55% de fer de l'échantillon correspondant à la proportion de centre typique mesurée dans l'expérience précédente (Fig I-5-3-1).

Cette expérience permet donc de conclure que le centre $[\text{4Fe-4S}]$ typique est vraisemblablement sensible à la SAM.

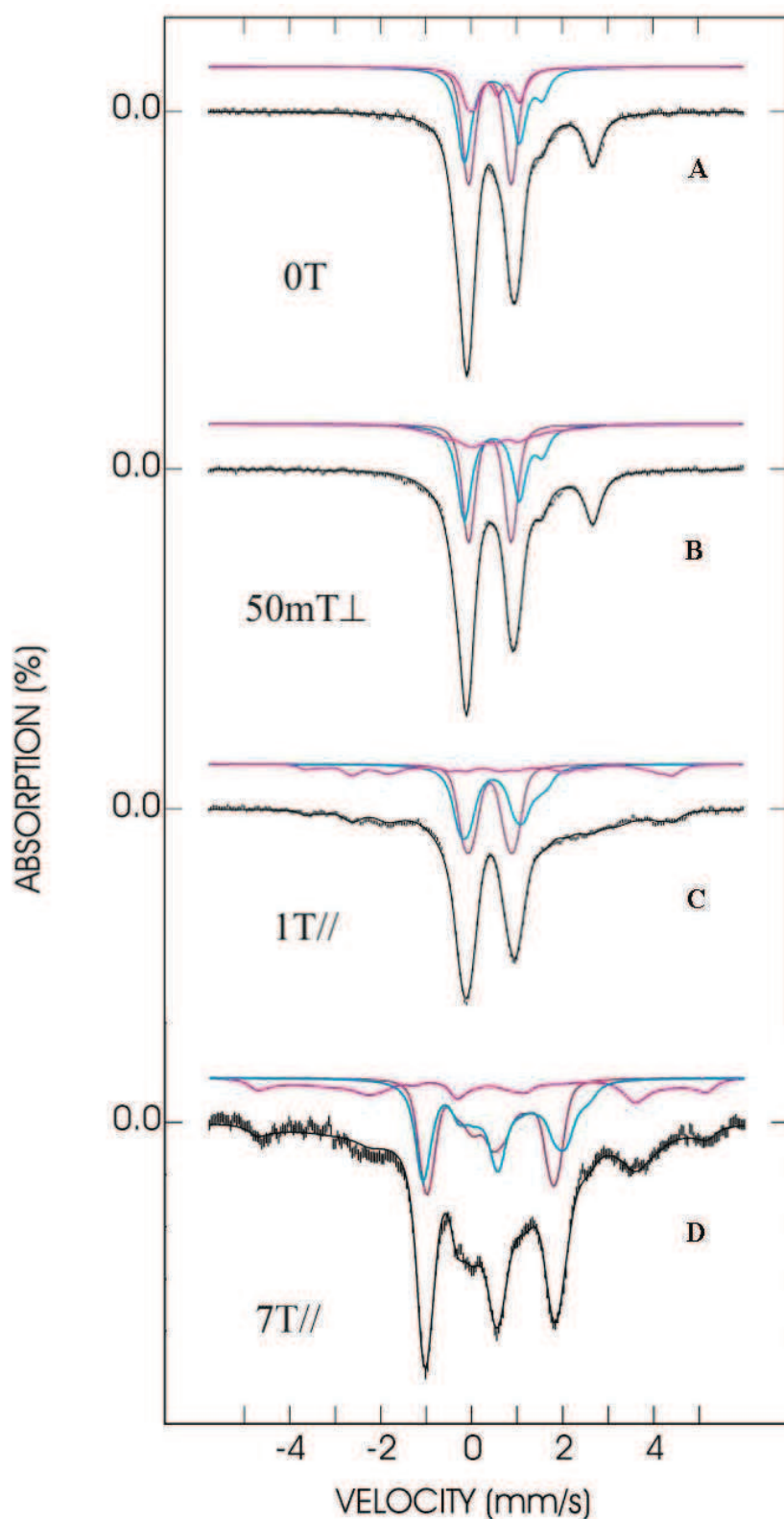


Figure I-5-3-2 : Holo-RimO après reconstitution *in vitro* des centres $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ et ajout de SAM. L'échantillon d'holo-RimO ($V_f = 450 \mu\text{L}$ à $288 \mu\text{M}$) en présence de $3,2 \text{ mM}$ de SAM, a été enregistré sans champ (A), avec 50 mT de champ perpendiculaire à la source de rayon γ (B) et avec 1 T (C) ou 7 T (D) de champ parallèle à la source de rayon γ .

I-5-3-3) Spectre Mössbauer de RimO en conditions réductrices.

L'holo-RimO préparée avec du ^{57}Fe est réduite par ajout de 8 excès de dithionite. Les spectres d'absorption Mössbauer enregistrés à 4,2 K (noire, Fig I-5-3-3) sont obtenus en appliquant soit 50 mT de champ perpendiculaire (Fig I-5-3-3-A), soit 50 mT (Fig I-5-3-3-B) ou 7 T (Fig I-5-3-3-C) de champ parallèle aux rayons γ . Un enregistrement à 20 K a été réalisé avec 7 T de champ parallèle cependant aucune simulation n'a pu être entreprise sur cet enregistrement en raison d'un trop grand nombre d'états excités (Fig I-5-3-3-D).

Sur les spectres présentés ci-dessous (Fig I-5-3-3), les 10% d'absorption dus au Fe^{II} sont soustraits et les 90% d'absorption restante sont simulés comme un centre $[\text{4Fe-4S}]^+$ de spin $S = 1/2$. Cette simulation, présentée ci-dessous, permet d'obtenir les paramètres du couple $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$ ($\delta = 0.50$ mm/s, $\Delta\text{EQ} = 1.30$ mm/s) (jaune, Fig I-5-3-3) et du couple $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{II}}$ ($\delta = 0.55$ mm/s, $\Delta\text{EQ} = 1.90$ mm/s) (rouge, Fig I-5-3-3).

En conditions réductrices, les deux centres $[\text{4Fe-4S}]^+$ de l'holo-RimO ne sont pas différenciables et sont modélisés dans cette étude comme un seul centre $[\text{4Fe-4S}]^+$ de spin $S=1/2$ à l'état fondamental. Cependant l'étude RPE montre la présence d'un signal à bas champ attribué à un centre $[\text{4Fe-4S}]^+$ de spin $S>1/2$. Ce signal, difficilement détectable, n'a pas été pris en compte lors des simulations Mössbauer présentées ci-dessous (Fig I-5-3-3).

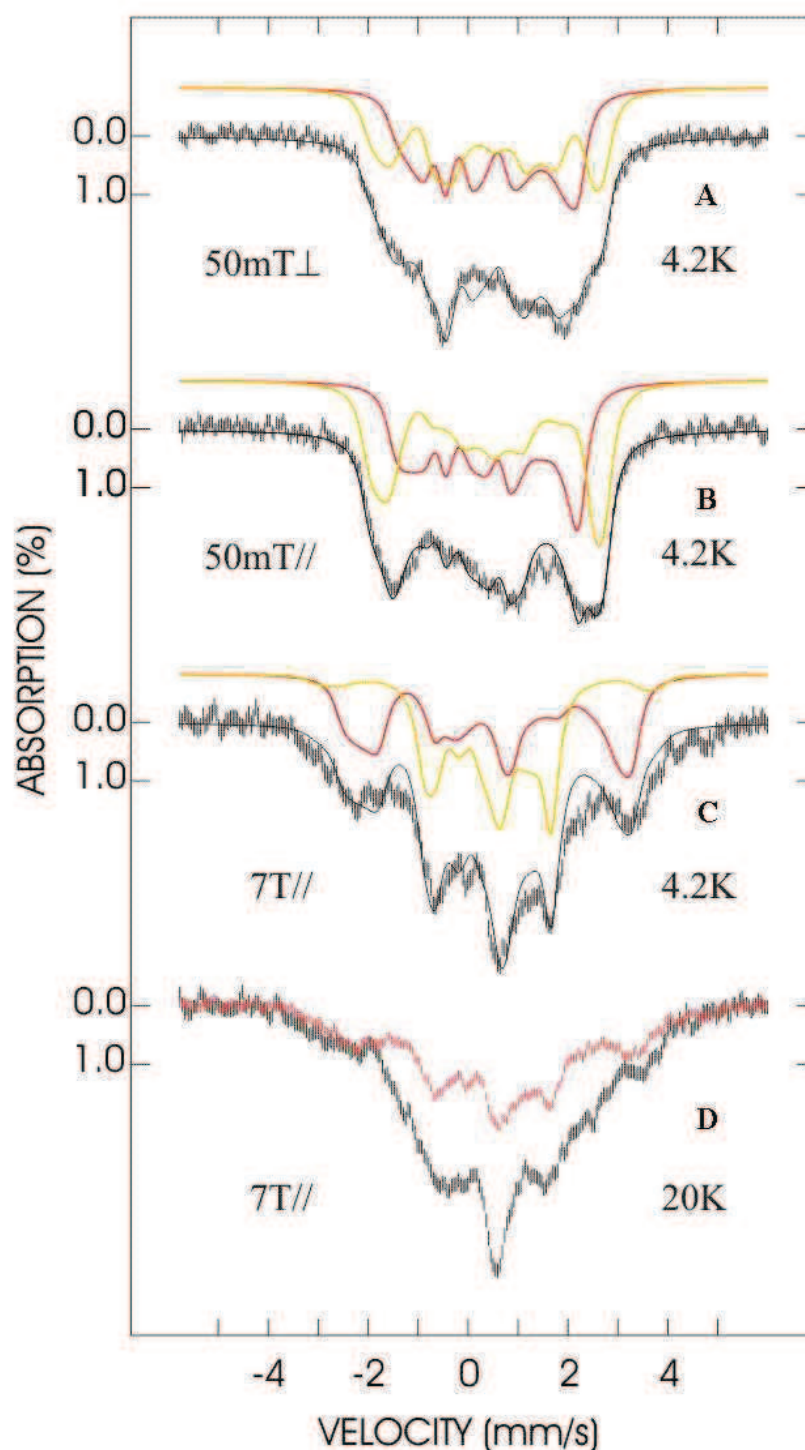


Figure I-5-3-3 : Spectres Mössbauer de l'holo-RimO en conditions réductrices. Spectre Mössbauer des centres $[4\text{Fe}_4\text{S}]^+$ enregistrés à 4,2 K ($V_f = 450 \mu\text{L}$ à $288 \mu\text{M}$) soumis à 50 mT de champ perpendiculaire (A), 50 mT (B) et 7 T (C) de champ parallèle et un enregistrement à 20 K (D) avec 7 T de champ parallèle (en noir) et 50% du spectre à 4,2K (en rouge). La simulation de cette absorption est réalisée avec un couple $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$ représenté en jaune ($\delta = 0.50 \text{ mm/s}$, $\Delta E_Q = 1.30 \text{ mm/s}$, $\Gamma = 0.35 \text{ mm/s}$, $\eta = 0.90 \text{ mm/s}$, $A = (-22, -25, -21) \text{ T}$) et un couple $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{II}}$ représenté en rouge ($\delta = 0.55 \text{ mm/s}$, $\Delta E_Q = 1.90 \text{ mm/s}$, $\Gamma = 0.35 \text{ mm/s}$, $\eta = 0 \text{ mm/s}$, $A = (17, 6, 9) \text{ T}$).

I-5-3-4) Spectre Mössbauer de RimO en conditions réductrices et en présence de SAM.

Les spectres Mössbauer de l'holoprotéine RimO en conditions réductrices (8 excès de dithionite) et en présence de SAM, sont présentés ci-dessous (Fig I-5-3-4). Les spectres d'absorption enregistrés avec 50 mT de champ parallèle (Fig I-5-3-4-A) et 50 mT de champ perpendiculaire (Fig I-5-3-4-B) sont simulés (noir A et B, Fig I-5-3-4) avec 71% du signal d'absorption de centres $[4\text{Fe-4S}]^+$ (rouge A et B, Fig I-5-3-4) observé pour l'échantillon précédent (A et B, Fig I-5-3-3). Ceci permet de montrer que 71% du fer de cette échantillon est impliqué dans des centres $[4\text{Fe-4S}]^+$. La soustraction des spectres noirs avec leurs spectres rouges respectifs (noir C et D, Fig I-5-3-4) permet de constater qu'ils sont identiques. Ceci signifie que les espèces possèdent un spin entier, compatibles avec des centres $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ et/ou du fer ferreux. Les proportions sont les suivantes : présence de 13% du fer dans un centre $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ ($\delta = 0,44 \text{ mm/s}$, $\Delta E_Q = 1,01 \text{ mm/s}$) représenté en bleu et le reste du fer sous forme de fer ferreux avec 9 % de Fe^{II} ($\delta = 0,65 \text{ mm/s}$, $\Delta E_Q = 2,05 \text{ mm/s}$) en vert clair et 7 % de Fe^{II} ($\delta = 1,17 \text{ mm/s}$, $\Delta E_Q = 2,97 \text{ mm/s}$) en vert foncé.

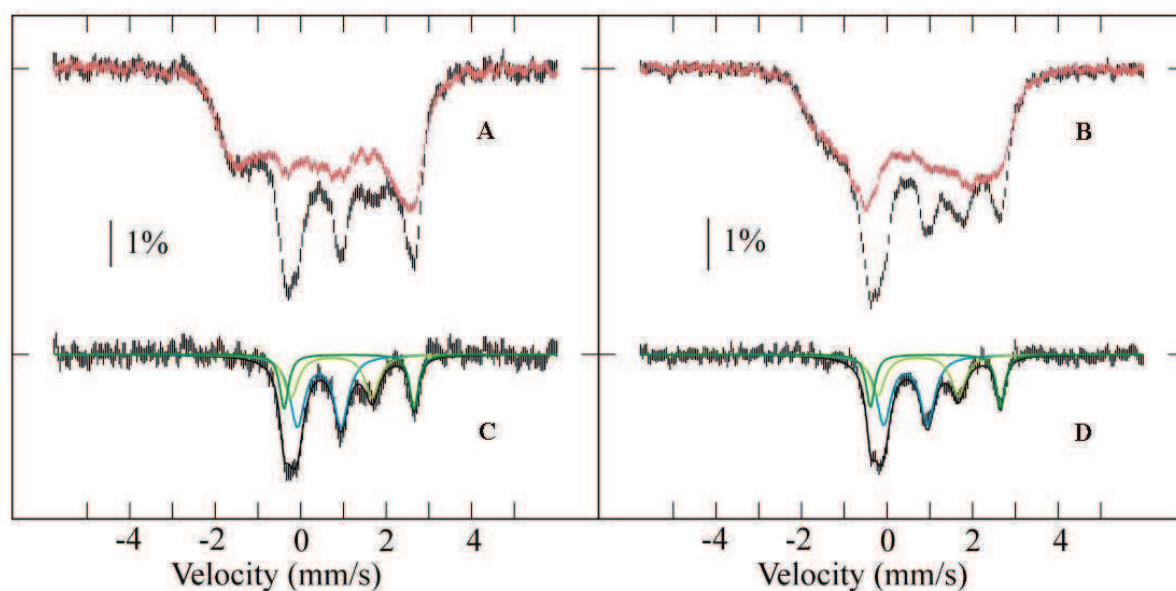


Figure I-5-3-4 : Spectres Mössbauer de l'holoenzyme RimO en conditions réductrices, en présence de SAM. L'holoprotéine RimO ($V_f = 450 \mu\text{L}$ à $288 \mu\text{M}$) réduite par ajout de 8 excès de dithionite en présence de 3,2 mM de SAM. Les enregistrements à 4,2 K avec 50 mT de champ parallèle (A, noir) et perpendiculaire (B, noir) révèlent la présence de 71% de $[4\text{Fe-4S}]^+$ (rouge). La différence des spectres (noir – rouge) permet d'obtenir les spectres C et D modélisables par 16% de Fe^{2+} et 13% de Fe^{2+} dans un centre $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$.

I-6) Test d'activité enzymatique de RimO.

La protéine ribosomale S12 est une protéine extrêmement basique (pI = 11,4) qui se trouve, d'après la structure du ribosome procaryote, au centre de la petite sous unité 30S entourée d'ARNr 16S. Après clonage du gène *rpsL* de *T. maritima* qui code pour la protéine ribosomale S12, plusieurs essais de surexpression hétérologue dans *E. coli* ainsi que différentes conditions de purification ont été testées qui se sont avérés négatifs à cause d'une instabilité *in vitro* probablement due à son caractère basique. Pour contourner ce problème, le test d'activité de l'holoprotéine RimO a été mis au point avec un peptide de 20 acides aminés (M = 2252,7 Da), copie conforme de la boucle conservée de la protéine ribosomale S12, possédant en son centre l'acide aspartique (D) cible. Le test d'activité a été réalisé en boîte à gants à 50°C pendant 1h en fixant un rapport enzyme : substrat égal à 1:5 (6 µM d'enzyme) en présence de 2 mM de dithionite et de 200 µM de SAM.

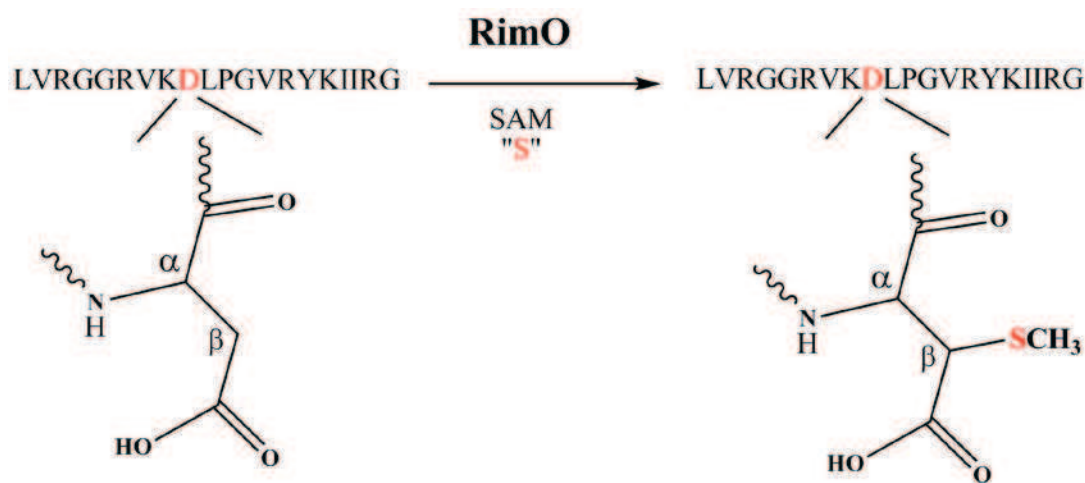


Figure I-6 : Réaction catalysée par l'holo-RimO avec un peptide mimétique de la protéine ribosomale S12 contenant en son centre l'aspartate cible en rouge.

I-6-1) Détection des produits de la réaction.

Pour détecter l'activité de l'holoprotéine RimO, un protocole a été établi en utilisant une colonne HPLC de type C4 (M&M III-12) couplé à un spectromètre de masse (API 3000, triple quadrupole, Turbo Ion spray). L'analyse du milieu réactionnel montre la présence de trois pics éluant à 17,64 min, 18,55 min et 24,5 min. Les spectres de masse de chacune des espèces peptidiques sont présentés en Fig I-6-1-A. Pour l'état de protonation + 5, le rapport $m/z = 451,6$ indique la présence du peptide seul possédant une masse $M = (451,6 \times 5) - 5 =$

Résultats.

2253 Da en accord avec la masse théorique de 2252,7 Da. De la même manière, le rapport $m/z = 460,9$ montre la présence d'un peptide mono-thiométhylé (+ 47 Da) avec une masse de $M = (460,9 \times 5) - 5 = 2299,5$ Da. Enfin, le rapport $m/z = 470,4$ traduit la présence d'un peptide bis-thiométhylé (+ 94 Da) avec une masse $M = (470,4 \times 5) - 5 = 2347$ Da (Fig I-6-1-A).

Sur la base des aires HPLC des peptides mono- et bis-thiométhylés, on peut évaluer à environ 2,3 le nombre de cycles catalytiques réalisé par l'enzyme RimO (0,7 nmoles de produits/ 0,3 nmoles d'enzyme = 2,3 produit par holo-RimO).

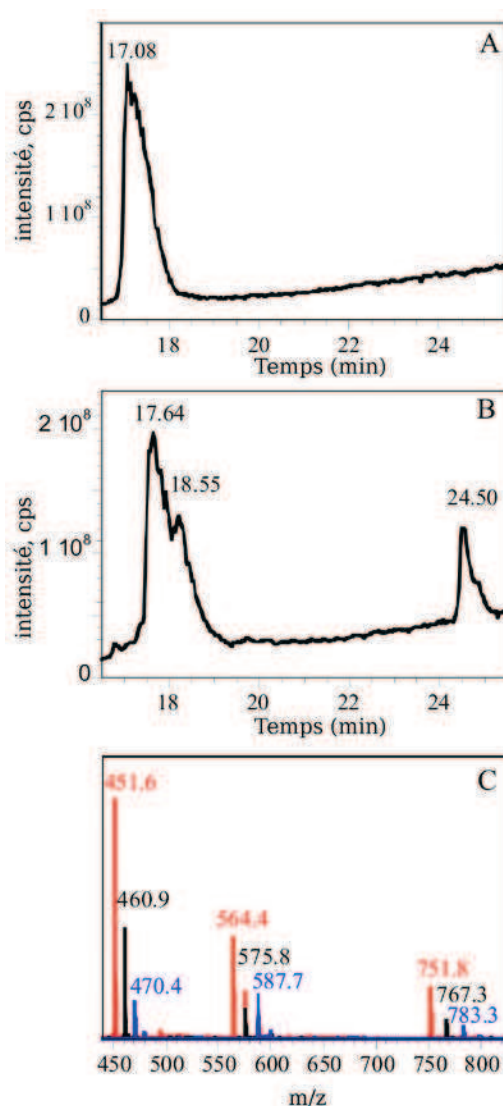


Figure I-6-1-A : Détection par C4-HPLC-MS des produits de la réaction catalysée par l'holo-RimO. Chromatogramme du peptide mimétique commercial (A), Chromatogramme du peptide après incubation avec l'holo-RimO au cours du test d'activité (B), montrant l'apparition de deux pics l'un à 18,55 min et l'autre à 25,5 min assignés par spectrométrie de masse respectivement au peptide monothiométhylé et bis-thiométhylé. Le spectre de masse des pics HPLC est présenté avec le peptide non modifié (en rouge), peptide monothiométhylé (en noir), et bis-thiométhylé (en bleu) pour les états de protonation + 5, + 4, et + 3 (C).

Pour localiser les sites de modification sur le peptide, une étude en spectrométrie de masse ESI-MS/MS a été réalisée en collaboration avec Sylvie Kieffer du laboratoire EDyP (CEA-Grenoble). La fragmentation peptidique (MS_2) mise en jeu par cette technique permet l'observation des ions y et b à l'état de protonation + 2 (Fig I-6-1-B).

Pour le peptide non modifié, les rapports m/z correspondant aux ions $(b_8)^{2+}$, $(b_9)^{2+}$, $(b_{10})^{2+}$, $(y_9)^{2+}$ et $(y_{10})^{2+}$ ont été annotés (Fig I-6-1-B (a)) à partir du calcul de leurs masses comparées aux masses théoriques attendues. Ainsi, pour l'ion $(b_8)^{2+}$ le rapport $m/z = 433,79$ permet de calculer la masse de cet ion ($M_b = M_{AA} + 1$; $M_{AA} = (433,79 \times 2) - 2 = 865,58$; $M_b = 865,58 + 1 = 866,58$ Da) en accord avec la masse théorique de 866,56 Da et pour l'ion $(b_9)^{2+}$ le rapport $m/z = 491,30$ permet de calculer la masse de cet ion ($M_b = M_{AA} + 1$; $M_{AA} = (491,30 \times 2) - 2 = 980,6$; $M_b = 980,6 + 1 = 981,6$ Da) en accord avec la masse théorique de 981,59 Da.

Pour le peptide mono-thiométhylé, l'ion $(b_8)^{2+}$ possédant un rapport $m/z = 433,79$ est toujours détecté cependant l'ion $(b_9)^{2+}$ possède un rapport $m/z = 514,29$ c'est-à-dire correspondant à une masse de 1027,58 Da ($M_b = M_{AA} + 1$; $M_{AA} = (514,29 \times 2) - 2 = 1026,58$; $M_b = 1026,58 + 1 = 1027,58$ Da). La différence de masse entre l'ion $(b_9)^{2+}$ non modifié et l'ion $(b_9)^{2+}$ issu du peptide mono-thiométhylé est de 45,99 Da ($1027,58 - 981,59 = 45,99$ Da) correspondant à une incrémentation de 47 Da (SCH_3) diminué de l'arrachement d'un proton (1 Da) sur l'aspartate 9 du peptide (Fig I-6-1-B (b)). Ce groupement thiométhyle est très probablement positionné sur le carbone β de l'aspartate comme proposé par Kowalak JA et Walsh KA (72).

Pour le peptide bis-thiométhylé, seule l'ion $(y_{11})^{2+}$ possédant un rapport $m/z = 636,55$ donc une masse de 1272,1 Da ($M_b = [(636,55 \times 2) - 2] + 1 = 1272,1$), a pu être détecté indiquant que la bis-thiométhylation a lieu sur le fragment LVRGGRVKD (Fig I-6-1-B (c)).

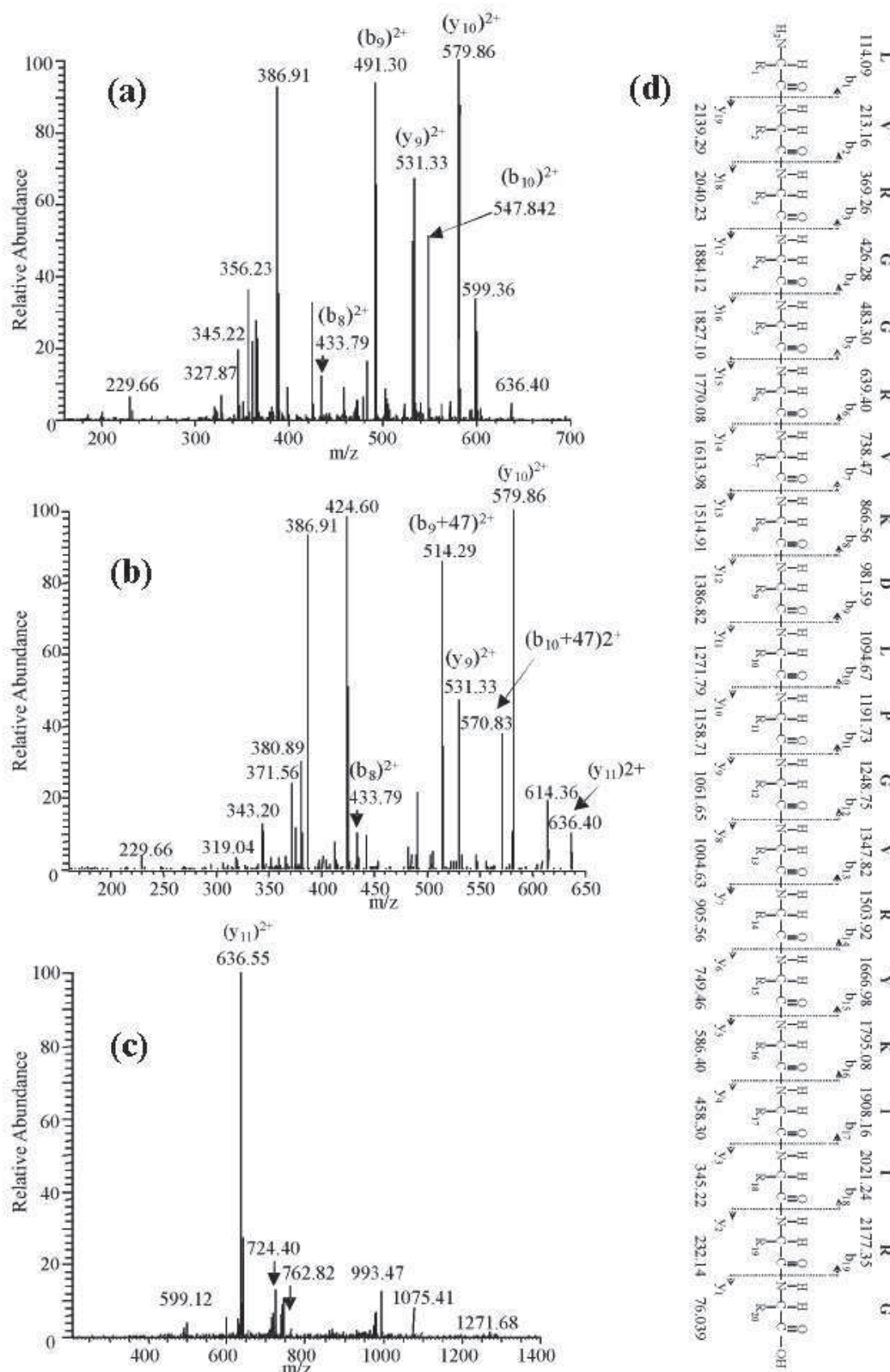


Figure I-6-1-B : Spectres de masse ESI-MS/MS des peptides non modifié et thiométhylé. (a) MS₂ du peptide non modifié, (b) MS₂ du peptide mono-thiométhylé et (c) MS₂ du peptide bis-thiométhylé.

I-6-2) Détection des sous-produits de la réaction.

Les sous-produits de la réaction sont analysés sur colonne C18 par HPLC (M&M III-12-3). Le chromatogramme présenté ci-dessous (Fig I-6-2) montre l'élution de la 5'-désoxyadénosine (AdoH), de la S-Adénosylhomocysteine (SAH), de l'adénine et de la thiomethyladénosine (MTA). Ces deux derniers sont des produits de décomposition de la SAM qui varient proportionnellement avec l'augmentation de la température et du temps d'incubation.

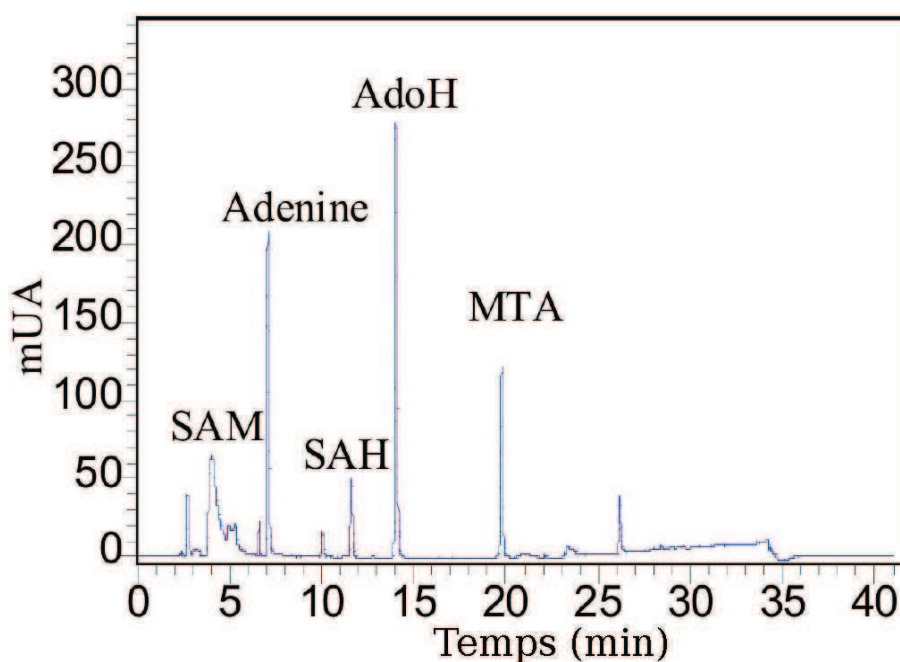


Figure I-6-2 : Analyse HPLC des sous-produits de la réaction catalysée par l'holo-RimO. Après 1 heure d'incubation à 50°C, les échantillons sont centrifugés (13 000 rpm, 5 min) puis injectés sur colonne C18. Les temps de rétention de chacun des composés présents dans le milieu réactionnel ont été attribués par injection de standards commerciaux.

Il n'y a pas de réaction de thiométhylation si un des constituants du test d'activité enzymatique est absent. Cependant, il est intéressant de noter qu'en absence de dithionite et de peptide, on observe une production de SAH dans un rapport SAH/ holo-RimO égal à 0,6. En présence de dithionite, ce rapport augmente jusqu'à 5,6. La production d'AdoH, elle, dépend de la présence de tous les constituants du test d'activité enzymatique.

I-6-3) Cinétique de formation des sous-produits de la réaction.

A partir de l'injection de standards de SAH, AdoH, Adénine et MTA en HPLC, des courbes étalons sont obtenues permettant de quantifier ces composés dans le milieu réactionnel. La cinétique présentée ci-dessous montre la consommation de la SAM (\diamond), la formation des sous-produits de la réaction (SAH (\blacktriangledown) et AdoH (\bullet)) mais aussi les produits de dégradation de la SAM, (Adénine (\square) et MTA (X)), au cours de la réaction (Fig I-6-3).

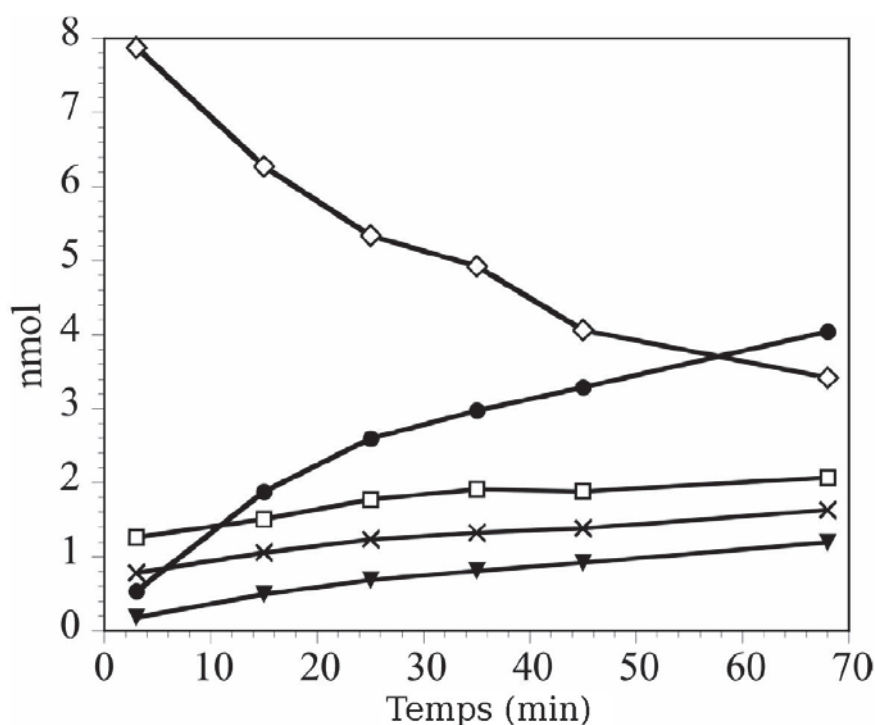


Figure I-6-3 : Cinétique de formation des sous-produits de la réaction de RimO avec son substrat peptidique. Le test d'activité est réalisé avec un rapport enzyme / substrat = 1/5 (M&M III-12-3) en présence de SAM (200 μ M) et de dithionite (2 mM) dans du tampon Tris-Cl 50 mM pH : 8, NaCl 50 mM. La réaction est incubée à 50°C. Aux temps indiqués un aliquot de 50 μ L est prélevé et la réaction arrêtée par ouverture à l'air.

La cinétique de la formation d'AdoH est biphasique, importante pendant les 25 premières minutes puis plus faible au cours des 45 minutes suivantes. Pour une quantité de 0,3 nmoles d'enzyme, la production d'AdoH est égale à 4,04 nmoles soit un rapport de 13,4 (Tableau I-6-2). Ceci traduit un découplage entre la production d'AdoH et l'activité thiométhyltransférase. En effet, le rapport enzyme/substrat étant égal à 1:5, l'activité maximale théorique ne peut excéder 5. La production de SAH est linéaire au cours de la cinétique. Pour une quantité de 0,3 nmoles d'enzyme, 1,19 nmoles de SAH sont produites correspondant à un rapport de 3,9. Bien que la quantité de SAH soit supérieure à la quantité

de produit détecté par HPLC-MS, le découplage de la production de SAH reste modéré comparé à celui observé avec AdoH.

I-7) Structure cristallographique de l'apo-RimO *T. maritima*.

L'étude cristallographique de RimO de *T. maritima* a été réalisée à l'Université de Columbia en collaboration avec le Pr. J. Hunt, le Pr. G. T. Montelione, le Dr. F. Forouhar et le Dr. H. Neely, membres du consortium NESG (North East Structural Genomics Consortium).

Des cristaux de l'apo-RimO ont été obtenus en présence de subtilisine (M&M IV-3). Cette protéase aspécifique est connue pour faciliter la formation de cristaux en clivant les parties flexibles de la protéine. Ces cristaux ont permis d'obtenir une structure tridimensionnelle tronquée de l'apo-RimO à une résolution de 2 Å (Table I-7). L'ensemble du domaine N-terminal de la protéine correspondant aux résidus 1-134 est absent de la structure ainsi que les segments correspondants aux résidus 149-161 et 330-340. Dans la protéine RimO, le motif Radical-SAM est constitué des cystéines C₁₄₈C₁₅₂C₁₅₅. La cystéine 148 est la seule cystéine de ce motif présente dans la structure (Fig I-7-1).

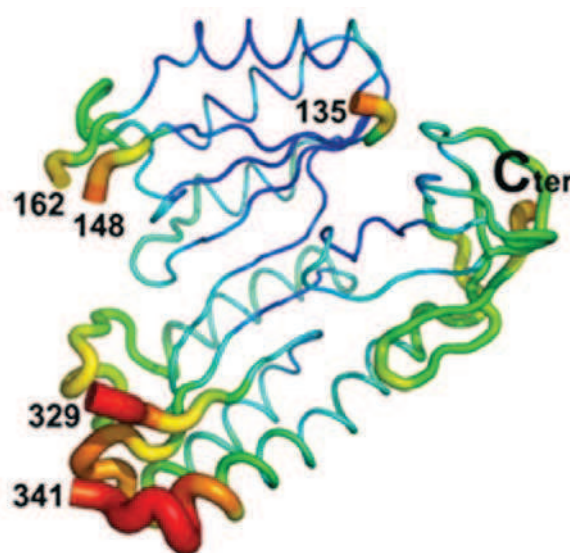


Figure I-7-1 : Structure de l'apo-RimO représentée en fonction du facteur B montrant le degré de désordre dans le cristal avec, pour les couleurs froides (bleu) les parties les plus ordonnées et pour les couleurs chaudes (rouge) les parties les désordonnées. Les acides aminés encadrant les segments manquants (1-147; 136-161; 330-340) sont indiqués dont la cystéine 148 faisant partie du motif Radical-SAM.

Groupe d'espace	P1
Paramètres de cellule (Å)	88,6 x 88,7 x 96,0 Å (91,0°; 90,0°; 89,9°)
Résolution (Å)	29,9 – 2,00 (2,07–2,00)
Nombres de réflexions	61,067
Redondance significative	1,7
$\langle I/s_i \rangle$	14,2 (3,5)
$R_{sym} (\%)^b$	6,6 (36,0)
Complétude (%)	96,6 (96,0)
$R_{work} (\%)^c$	21,2 (23,4)
$R_{free} (\%)^d$	25,1 (27,3)
Rmsd des longueurs de liaison (Å)	0,006
Rmsd des angles de liaison (Å)	1,1
Contenu du model	
Résidus de la protéine	A: 135-148, 162-329, 341-430 B, E, H: 136-147, 162-329, 341-430 C, D, F, G: 136-146, 162-329, 341-430
Hétéroatomes	4 (3_cyclohexyl-1-propylsulfonic acid) 1442 H ₂ O
Distribution Ramachandran:	
Centre	91,3 %
Additionné en plus	9,0 %
Toléré généreusement	0 %
Rejeté	0,8 %
^a Nombre entre parenthèses sont donné pour la plus forte résolution.	
^b $R_{merge} = \sum_h \sum_i I_{hi} - \langle I_h \rangle / \sum_h \sum_i I_{hi}$	
^c $R = \sum_h F^0_{hi} - F^c_h / \sum_h F^0_h$	

Table 1-7 : Paramètres structuraux des cristaux d'apo-RimO de *T. maritima*.

Malgré l'absence des segments impliqués dans la fixation des centres [4Fe-4S]^{2+/+}, de nombreuses informations ont pu être obtenues grâce à cette structure.

Tout d'abord, il s'agit de la première structure d'une méthylthiotransférase déposée dans la PDB. Elle a permis de montrer que le domaine Radical-SAM (bleu, Fig I-7-2) de RimO est formé de 7 hélices alpha et de 6 feuillets beta ($\alpha 7\beta 6$), correspondant à une structure incomplète ($\alpha 7\beta 6$) de type TIM Barrel ($\alpha 8\beta 8$) caractéristique de toutes les enzymes Radical-SAM dont les structures sont connues.

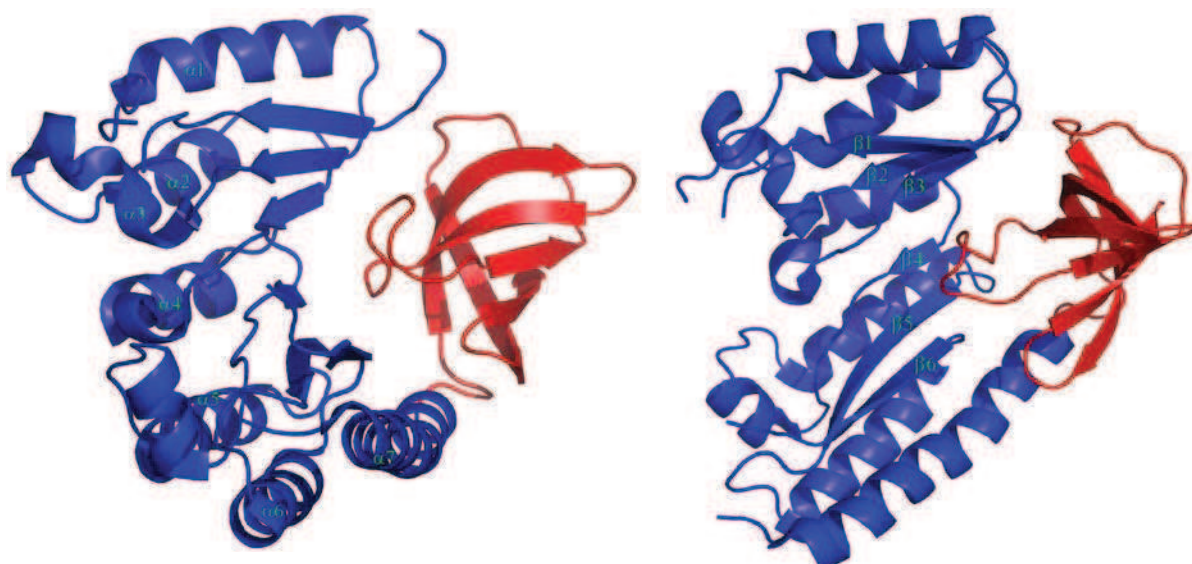


Figure I-7-2 : Structure cristallographique des domaines TRAM et Radical-SAM de l'apo-RimO de *T. maritima*. Le domaine Radical-SAM de RimO en bleu et le domaine TRAM en rouge (PDB : 2QGQ).

Une recherche dans la PDB avec le programme DALI a permis de montrer que le domaine structural le plus proche de RimO est celui de la coproporphyrinogène III déshydrogénase oxygène-indépendante (PDB ID : 1OLT). D'autres domaines Radical-SAM sont proches de RimO notamment celui de MoaA, une enzyme impliquée dans la biosynthèse du cofacteur à molybdène (PDB ID : 2FB2).

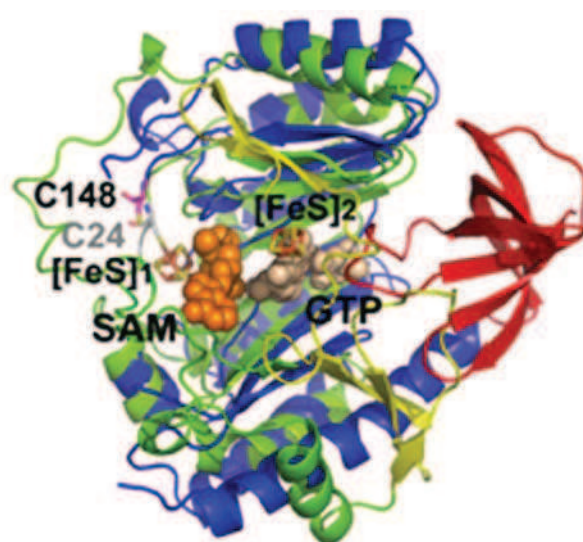


Figure I-7-3: Superposition des domaines TRAM et Radical-SAM de l'apo-RimO de *T. maritima* (bleu et rouge) avec MoaA (vert et jaune). Les positions relatives des centres [4Fe-4S] de MoaA sont notés [Fe-S]₁ et [Fe-S]₂. Les atomes de la SAM (orange) et du GTP (saumon) sont représentés sous forme de sphères.

La comparaison de la structure de l'apoprotéine RimO avec MoaA est particulièrement appropriée puisque la structure de cette dernière contient deux centres $[4\text{Fe-4S}]^{2+/+}$, l'un fixé au site Radical-SAM nécessaire pour la formation de Ado^\bullet à partir de la SAM et l'autre coordonné par trois cystéines présentes dans le domaine C-terminal servant à la fixation du GTP. La superposition structurale de MoaA et de RimO (Fig I-7-3) montre que le motif $\text{CX}_3\text{CX}_2\text{C}$, est très probablement positionné au même endroit dans les deux structures et permet de visualiser la fixation de la SAM par son groupement amino-carboxylate sur le centre $[4\text{Fe-4S}]$ du motif Radical-SAM de MoaA (Fig I-7-4).

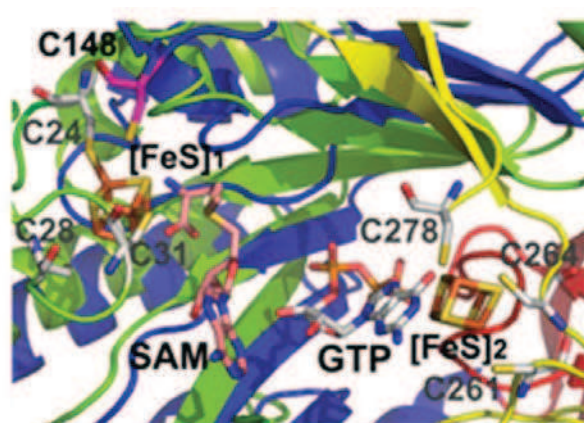


Figure I-7-4: Vue rapprochée de la superposition des domaines TRAM et Radical-SAM de l'apo-RimO de *T. maritima* (bleu et rouge) avec MoaA (vert et jaune). Les centres $[4\text{Fe-4S}]$ de MoaA sont annotés $[\text{Fe-S}]_1$ et $[\text{Fe-S}]_2$ et représentés en "bowl and stick".

La majorité des structures secondaires des domaines Radical-SAM de RimO et de MoaA sont conservées (Fig I-7-3). Seule la dernière longue hélice α du domaine Radical-SAM de RimO n'est pas conservée dans la structure de MoaA. Cependant, le coté C-terminal du domaine Radical-SAM de MoaA (En Jaune, Fig I-7-3, Fig I-7-4) contient des éléments structuraux supplémentaires nécessaires à la fixation du centre $[4\text{Fe-4S}]^{2+/+}$ impliqués dans la reconnaissance et l'activation du GTP. La partie C-terminale de MoaA recouvre en partie la surface concave du TIM-barrel (Fig I-7-3, Fig I-7-4) et forme un site actif proche du motif Radical-SAM. Dans le cas de RimO, le positionnement d'un substrat macromoléculaire comme la protéine S12 nécessite probablement une réorganisation structurale importante. En accord avec cette contrainte, le segment de la protéine MoaA, contenant les trois cystéines impliquées dans la fixation du centre Fe-S liant le GTP, est absent du domaine Radical-SAM de RimO. Cela rend accessible la surface concave, où a lieu la réaction. Ainsi, par analogie avec MoaA qui fixe le GTP sur cette surface concave, la protéine S12 pourrait être reconnue directement par la surface concave de RimO (Fig I-7-5).

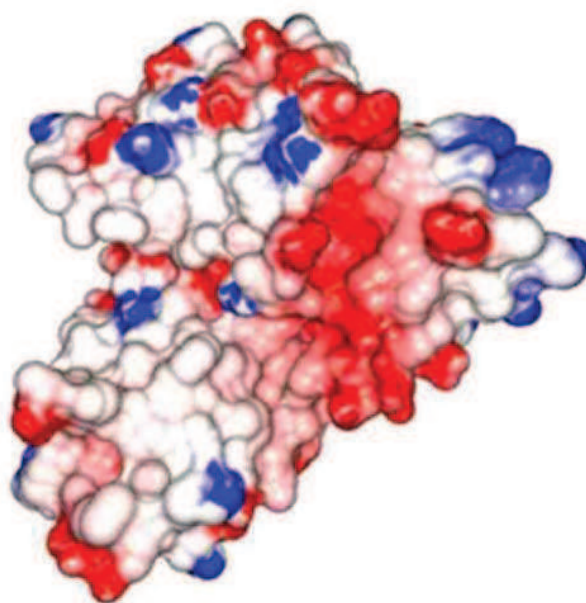


Figure I-7-5 : Structure cristallographique des domaines TRAM et Radical-SAM de l'apo-RimO de *T. maritima*. Surface électrostatique de RimO (rouge : acide, bleu : basique, blanc : neutre).

Le domaine TRAM a été proposé pour interagir avec les acides nucléiques et plus particulièrement les ARNt (94). Etant donné la très forte similarité de séquences entre RimO et MiaB, le domaine TRAM de ces deux enzymes paralogues est a priori supposé interagir dans la même conformation géométrique. Dans RimO le domaine TRAM (Rouge, Fig I-7-3, Fig I-7-5) est placé sur le bord distal de la surface concave du domaine Radical-SAM ce qui conforte l'hypothèse d'une reconnaissance macromoléculaire du substrat à la surface des thiométhyltransférases.

La topologie du domaine TRAM, formé de 5 feuillets beta anti-parallèles, est comparable à celle trouvée dans les autres structures possédant ce domaine (Fig I-7-6 (A)). En accord avec le programme DALI, le domaine structural le plus proche est trouvé dans une méthyltransférase de fonction inconnue (PDB ID 1K3R Fig. I-7-6-A). D'autres domaines TRAM ont une forte similarité avec celui de RimO notamment la méthyltransférase Ruma qui catalyse la méthylation de l'ARNr 23S (PDB ID 1UWV) (Fig I-7-6 (B)).

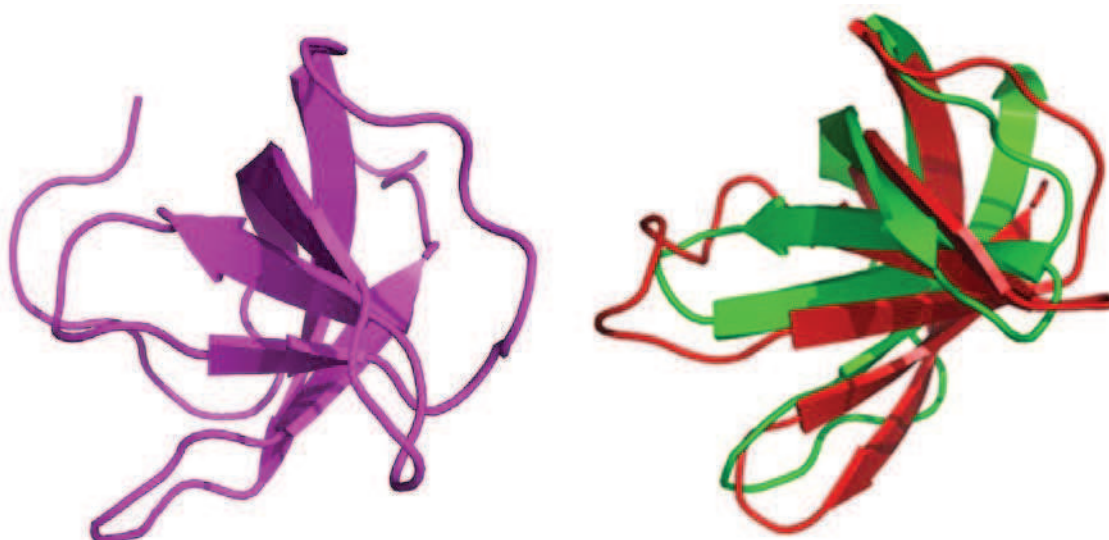


Figure 1-7-6 : Structure cristallographique du domaine TRAM en magenta (PDB : 1K3R) et superposition des domaines TRAM de RimO en rouge (PDB : 2QGQ) et de RmaA (PDB : 1UWV).

Les domaines TRAM sont impliqués dans la fixation de molécules d'ARN à l'instar de l'enzyme MiaB. Dans le cas de la protéine RimO qui intervient dans la modification de la protéine ribosomale S12 chargé positivement, la polarité de la surface de ce domaine est modifiée pour rendre possible l'interaction. En rouge, la surface acide du domaine TRAM de RimO a été proposée comme intervenant directement dans la reconnaissance de la protéine S12 basique ($pI = 12$) (Fig I-7-5). Cet environnement électrostatique est attribuable à la présence de résidus acides dans le domaine TRAM qui sont conservés dans toutes les séquences orthologues de protéines RimO mais pas dans les séquences paralogues de méthylthiotransférases impliquées dans la modification d'ARNt.

Cette structure d'apo-RimO a permis de mieux visualiser la position des différents composants de RimO. La seule cystéine du motif Radical-SAM visible dans la structure tronquée de RimO (Cys 148) est très proche d'une cystéine similaire de MoaA (Cys 24) (Fig I-7-3, Fig I-7-4). Ceci permet de positionner le centre $[4Fe-4S]$ du site Radical-SAM. Aucune information concernant la position du deuxième centre $[4Fe-4S]^{2+/1+}$ de RimO n'est disponible puisque le domaine N-terminal UPF0004 est absent de la structure.

Enfin, cette structure d'apo-RimO a été comparée avec les structures de quatre holoenzymes Radical-SAM : HemN, BioB, MoaA et HydE (Fig I-7-7). La structure de RimO est représentée en jaune. La position probable du domaine Radical-SAM de RimO a été

obtenue par superposition du centre [4Fe-4S] du site Radical-SAM de HemN (cyan, Fig I-7-7) avec la SAM coordonnée par son extrémité amino-carboxylate. Le domaine UPF0004 étant absent de la structure de l'apo-RimO, il a été schématisé sous la forme d'une ellipse et les flèches indiquent sa position probable.

La figure I-7-7 montre la position relative des deuxièmes centres [Fe-S] des quatre enzymes de comparaison superposés à la structure de l'apo-RimO. Ainsi, le centre [2Fe-2S] de BioB (en violet), le centre [4Fe-4S] de MoaA (en magenta) et le centre [2Fe-2S] de HydE (en rose) sont représentés et se retrouvent au centre du domaine Radical-SAM de RimO. Par opposition, RimO possède une organisation différente avec un centre [4Fe-4S] dans le domaine UPF0004 du côté N-terminal de la protéine.

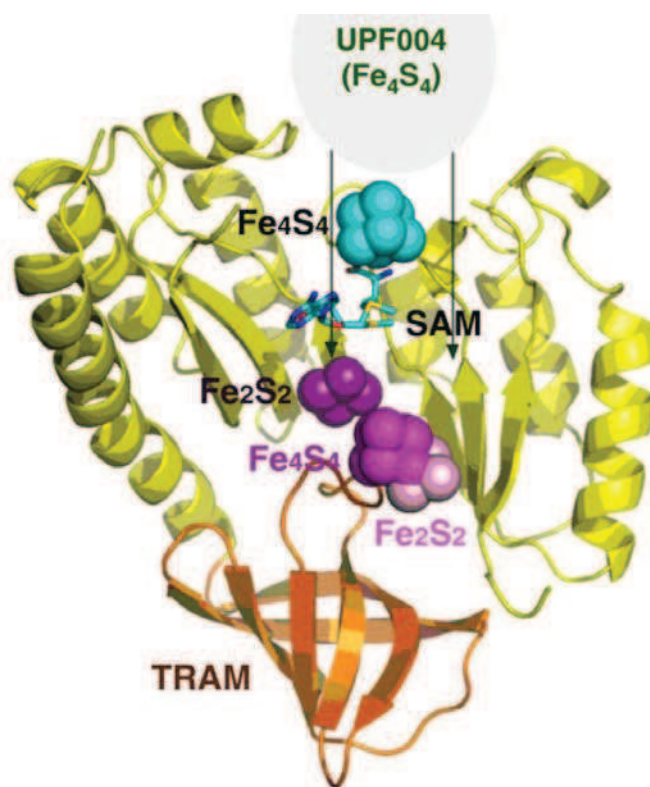


Figure I-7-7 : Superposition des centres [Fe-S] de quatre enzymes Radical-SAM sur la structure tridimensionnelle de l'apo-RimO. Cette figure a été générée grâce aux coordonnées PDB suivantes : HemN (PDB : 1OLT); RimO (PDB : 2QGQ); BioB (PDB : 1R30); MoaA (PDB : 2FB3), HydE (PDB : 3CIX).

La conservation remarquable du domaine Radical-SAM entre différentes enzymes de la famille permet de comparer ces structures entre elles. La superposition de la structure de l'activase de la pyruvate formate lyase (PFL-AE) contenant un peptide mimétique du site Gly de la PFL avec la structure partielle de l'apo-RimO permet de se représenter l'organisation

spatiale lors de la catalyse (Fig I-7-8). Comme indiqué plus haut, le centre [4Fe-4S] du motif Radical-SAM de la protéine RimO est très probablement positionné de la même manière que celui de la PFL-AE. Le centre [4Fe-4S] ainsi que la SAM sont représentés en cyan. Le peptide mimétique de la PFL (RVSGYAV) est représenté en vert. Cette superposition permet de visualiser l'emplacement hypothétique du substrat par rapport à la SAM et au centre [4Fe-4S] du site Radical-SAM.

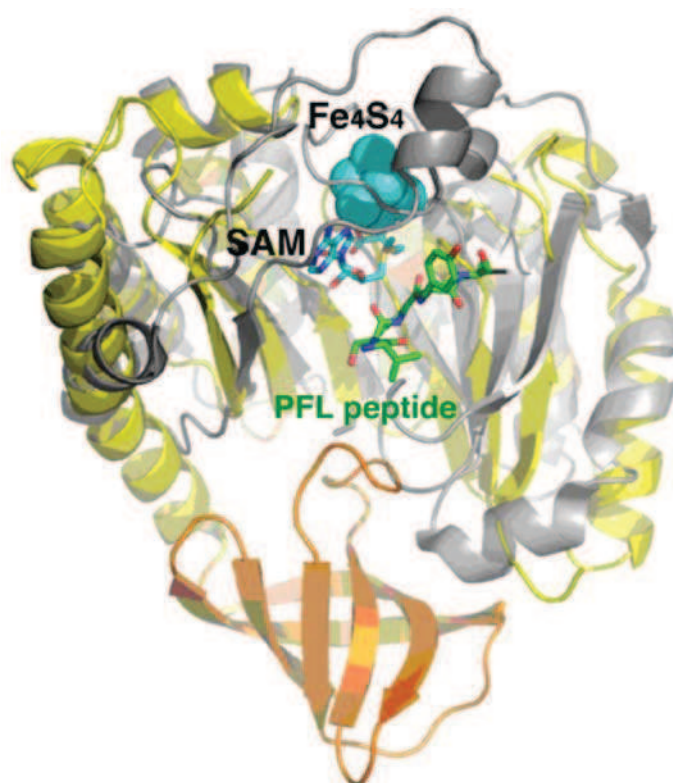


Figure 1-7-8 : Superposition de la structure tridimensionnelle de l'activase de la pyruvate formate lyase (PFL-AE) en gris et la structure partielle de l'apo-RimO en jaune. Cette superposition permet de visualiser l'emplacement de la SAM coordonnée par son extrémité amino-carboxylate au centre [4Fe-4S] du motif Radical-SAM. Cette structure montre la position relative du peptide par rapport au centre [4Fe-4S] de la PFL-AE. RimO (PDB : 2QGQ) et PFL-AE (PDB : 3CB8)(95).

I-8) Discussion.

Au cours de cette première partie, nous avons décrit comment l'apo-RimO de *T. maritima* a été surproduite de façon hétérologue dans l'organisme *E. coli* puis purifiée tout d'abord par chauffage (10 min 75°C) et ensuite par deux étapes de chromatographie (Butyl-Sépharose et Surperdex 75). L'holo-RimO a été préparée par reconstitution des centres [4Fe-4S]^{2+/+} en boîte à gants. Le dosage du fer et du soufre ainsi que l'étude spectroscopique (UV-vis, RPE et Mössbauer) montrent la présence de deux centres [4Fe-4S]^{2+/+} l'un au niveau du

motif Radical-SAM et l'autre au niveau du site « soufre ». Ces centres [Fe-S] sont liés à la protéine par 6 cystéines complètement conservées dans toutes les protéines RimO. Ces résultats obtenus avec RimO sont similaires à ceux publiés sur la protéine MiaB (71).

La spectroscopie Mössbauer a permis de montrer que l'un des centres $[4\text{Fe-4S}]^{2+/+}$ est atypique puisqu'il possède une paire $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$ partiellement localisée. L'attribution de ce signal atypique est en cours et nécessitera de réaliser des mutants de la protéine RimO de *T. maritima*. Seuls deux exemples de centres $[4\text{Fe-4S}]^{2+/+}$ atypiques sont décrits dans la littérature, le premier concerne la ferrédoxine thioredoxine réductase (FTR) (96) et le deuxième, l'activase de la pyruvate formate lyase (97). Dans le cas de la FTR, la présence d'une paire $\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}$ partiellement localisée serait due à un fer pentacoordiné par trois soufre pontants et deux cystéines (96). Dans le cas de l'activase de la PFL, cette paire localisée serait due à la coordination *in vivo* de composés de faible poids moléculaire comme l'AMP, conduisant probablement, là aussi, à un fer pentacoordiné (97).

L'étude de l'holo-RimO par spectroscopie Mössbauer montre que le centre typique à l'état $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ est sensible à l'ajout de la SAM (Fig I-5-3-2). En conditions réductrices, la spectroscopie Mössbauer montre que 90% des centres [Fe-S] sont sous forme réduite. Lorsque l'on ajoute de la SAM en conditions réductrices, 13% de centre $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ sont observés alors que 75% du fer est sous forme d'un centre $[4\text{Fe-4S}]^{+}$ et 16% sous forme Fe^{2+} . Il serait intéressant de regarder l'influence du peptide mimétique sur ces signaux d'absorption.

Un test d'activité de RimO *T. maritima* a été mis au point avec un peptide mimétique de la protéine ribosomale S12. Ce test montre que l'holoenzyme, avec ses deux centres $[4\text{Fe-4S}]^{2+/+}$ reconstitués en boîte à gants, est active *in vitro*. Une étude similaire menée sur RimO d'*E. coli* (88), a montré la présence de deux centres $[4\text{Fe-4S}]^{2+/+}$ et une activité très faible mesurée de 0,1 cycles catalytiques par monomère avec un peptide modèle de S12. Du strict point de vue de la catalyse il est clair que ces enzymes ne réalisent qu'un faible nombre de cycles catalytiques.

L'étude cristallographique de l'apo-RimO a permis de mieux comprendre l'organisation générale des MTTases. Le domaine Radical-SAM possède un repliement de type TIM barrel mais incomplet ($\alpha 7\beta 6$ au lieu de $\alpha 8\beta 8$). Ce type de repliement se retrouve au sein de différentes enzymes Radical-SAM dont la structure tridimensionnelle a été résolue :

MoaA (38, 39), BioB (43), HydE (98), HemN (99), PFL-AE (95), LAM (100). La présence de la cystéine 148 dans cette structure de l'apo-RimO permet de modéliser la position du centre [4Fe-4S] du site Radical-SAM. Par superposition de la structure de RimO avec quatre structures d'enzymes Radical-SAM possédant deux centres [Fe-S], nous pouvons dire que les MTTases possèdent une organisation différente avec un centre [4Fe-4S] dans le domaine N-terminal. La présence du domaine TRAM dans RimO pouvait paraître paradoxale puisque ce domaine est connu pour interagir avec des acides nucléiques. Cependant, cette étude a permis de montrer que le domaine TRAM de RimO, bien que structuralement proche des autres domaines TRAM décrits dans la littérature, possède une polarité inversée qui lui permet d'avoir une surface d'interaction acide nécessaire à la reconnaissance de la protéine ribosomale S12 basique.

II) Etude du mécanisme réactionnel des MTTases.

Comme nous l'avons montré dans l'introduction, une difficulté rencontrée pour l'étude des enzymes Radical-SAM impliquées dans des réactions d'insertion de soufre est qu'aucune de ces enzymes n'est capable de faire plus que 1-3 cycles catalytiques *in vitro* (BioB : 3 cycles catalytiques (46), MiaB *E. Coli* <1 cycle catalytique (Pierrel F, non publié), LipA moins de 1 (57, 59, 101). Du fait de ce faible nombre de cycles catalytiques *in vitro*, il a même été proposé que ces enzymes puissent être « sacrificielles » (62). Ainsi, dans la littérature, il est largement admis, notamment dans le cas de la biotine synthase que le soufre inséré lors de la catalyse provient directement du centre additionnel $[2Fe-2S]^{2+/+}$ (11). Dans ce type de mécanisme, les atomes de soufre présents dans le centre (aussi appelé « soufres pontants ») sont utilisés lors de la catalyse. Ceci revient à dire que ces centres $[Fe-S]$ ne sont plus des cofacteurs mais des co-substrats de la réaction enzymatique. Dans le cas des MTTases, l'origine et la nature du soufre inséré lors de la catalyse n'ont jamais été établies.

Du fait que les enzymes MoaA et BtrN, qui n'ont aucune connexion avec le métabolisme du Soufre, possèdent deux centres $[4Fe-4S]$, un centre Radical-SAM nécessaire pour générer Ado^\bullet et un deuxième centre $[4Fe-4S]$ impliqué dans la fixation du substrat, nous nous sommes demandés si les MTTases utilisaient une organisation comparable.

Nous avons donc fait l'hypothèse que la fonction du centre $[4Fe-4S]$ du site « soufre » des MTTases est de fixer et/ou activer une espèce soufrée, notée $-SX$, précurseur du soufre inséré dans le substrat (Flèches noires, Fig II). Dans cette hypothèse, Ado^\bullet produit par le site RS sert à former un intermédiaire $Substrat^\bullet$ qui réagit par couplage radicalaire avec l'espèce $-SX$ présente sur le « site soufre ». L'espèce $-SX$ insérée pouvant être soit $-SCH_3$ soit $-SH$ selon que l'étape de méthylation ait lieu avant ou après le transfert.

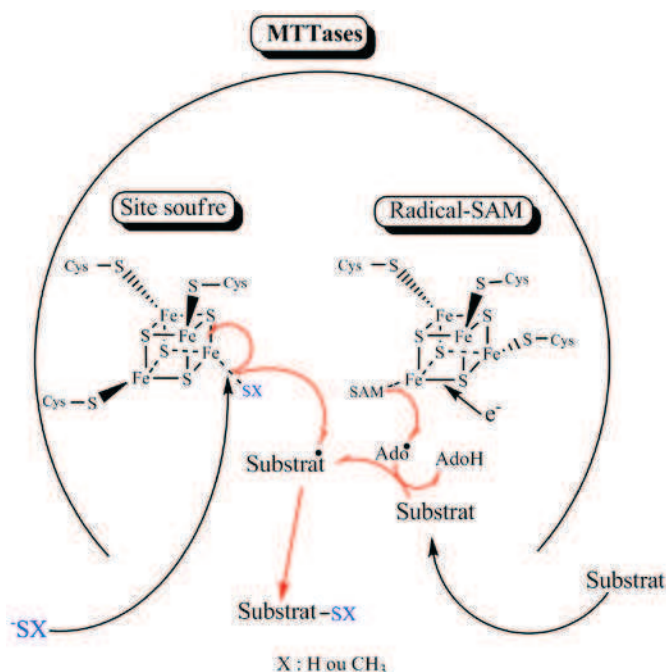


Figure II : Hypothèse de travail sur le fonctionnement des MTTases.

Dans ce chapitre, nous présenterons d'abord les essais d'optimisation des conditions expérimentales des tests d'activité de MiaB et RimO de *T. maritima*. Dans un deuxième temps, nous exposerons les résultats obtenus avec les différentes techniques spectroscopiques qui ont été mises en œuvre pour éclaircir le rôle joué par le centre $[4\text{Fe-4S}]^{2+/+}$ du site soufre ainsi qu'une proposition de mécanisme applicable à toutes les MTTases. Enfin, une discussion détaillée permettra de confronter l'ensemble de ces résultats à ceux décrits dans la littérature.

II-1) Activité catalytique de MiaB et RimO.

II-1-1) Etude préliminaire réalisée sur RimO.

II-1-1-1) Amélioration de la préparation de l'holo-RimO.

Après reconstitution des deux centres $[4\text{Fe-4S}]^{2+/+}$ de l'holo-RimO, la solution protéique est purifiée par filtration sur gel (NAP-25) et analysée sur une colonne Superdex 75 analytique préalablement calibrée en boîte à gants (Fig II-1-1-1). Le chromatogramme présenté en Figure II-1-1-1 montre, qu'après reconstitution, l'holo-RimO est majoritairement sous forme monomérique (trace bleue). Des formes oligomériques sont également présentes.

Cependant, nous avons observé qu'une étape de chauffage à 65°C pendant 30 min en présence de 5 mM de DTT permettait d'améliorer sensiblement l'homogénéité de la solution. (rouge). Les fractions contenant la protéine sous forme monomérique ont été utilisées pour les tests d'activité et les essais de cristallogénèse (Fig II-1-1-1).

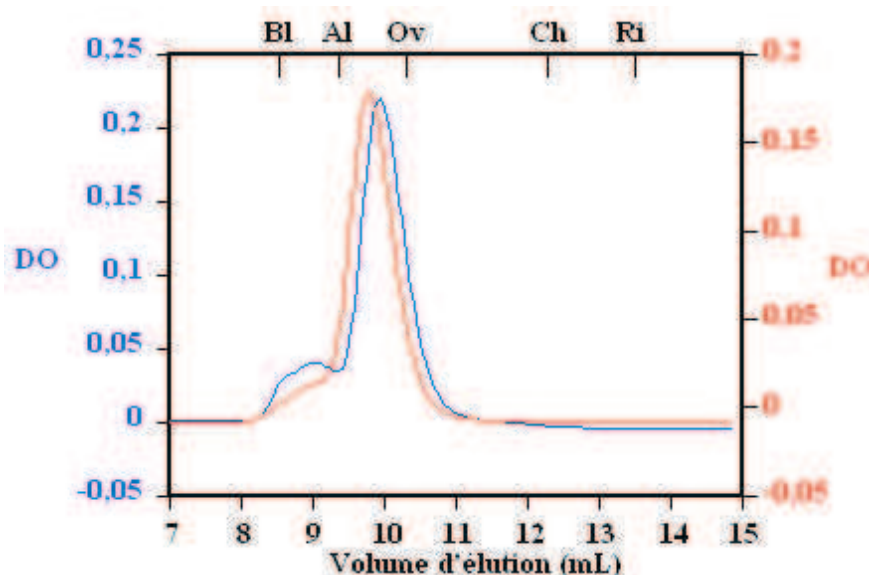


Figure II-1-1-1 : Chromatographie FPLC de holo-RimO sur Superdex 75 analytique en tampon Tris-Cl 10mM pH 7,5, NaCl 100 mM, 5 mM de DTT avant (bleu) et après (rouge) 30 min à 65°C en présence de 5 mM de DTT. Marqueurs de poids moléculaire : Bleu Dextran (8,53 mL, **Bl**), Albumine (67 000 Da; 9,4 mL, **Al**), Ovalbumine (43 000 Da; 10,3 mL, **Ov**), Chymotrypsinogène A (25 000 Da; 12,2 mL, **Ch**), Ribonucléase A (13 700 Da; 13,46 mL, **Ri**).

Le dosage du fer et du soufre contenus dans ces nouvelles préparations a donné les résultats suivants : $7,6 \pm 0,2$ Fe et $11,6 \pm 0,8$ S par monomère d'holo-RimO. La différence notable entre le soufre dosé avant ($8 \pm 0,8$) et après ($11,6 \pm 0,8$) chauffage en présence de DTT suggère une équilibration vers une forme monomérique capable de stocker du soufre. Parallèlement à ces améliorations du mode de préparation, une structure de l'holo-RimO a été obtenue dans le cadre de notre collaboration avec le Dr. Farhad Forouhar et de Dr John Hunt de l'Université de Columbia (New York).

II-1-1-2) Structure tridimensionnelle de l'holo-RimO.

Très récemment, en avril 2011, la structure de l'holo-RimO a été obtenue avec une résolution de 3,4 Å (Tableau II-1-1-2). Les trois domaines de l'enzyme sont représentés selon le code couleur utilisé dans le chapitre I, avec le domaine UPF0004 dans la partie N-terminale

en vert, le domaine Radical-SAM possédant un repliement de type TIM barrel incomplet $\alpha 7\beta 6$ en bleu et le domaine TRAM dans la partie C-terminale en rouge (Fig II-1-1-2-A). Les trois chaînes latérales des cystéines du motif Radical-SAM sont représentées en cyan alors que les trois chaînes latérales des cystéines strictement conservées présentes dans le domaine UPF0004 sont représentées en rouge (Fig II-1-1-2-A). Cette structure est la première structure d'une MTTase avec ses deux centres $[4\text{Fe-4S}]^{2+/+}$. La distance minimale entre deux atomes de fer de chacun des centres est de 8 Å. Une telle proximité entre deux centres $[4\text{Fe-4S}]^{2+/+}$ n'a jamais été rapportée dans la littérature.

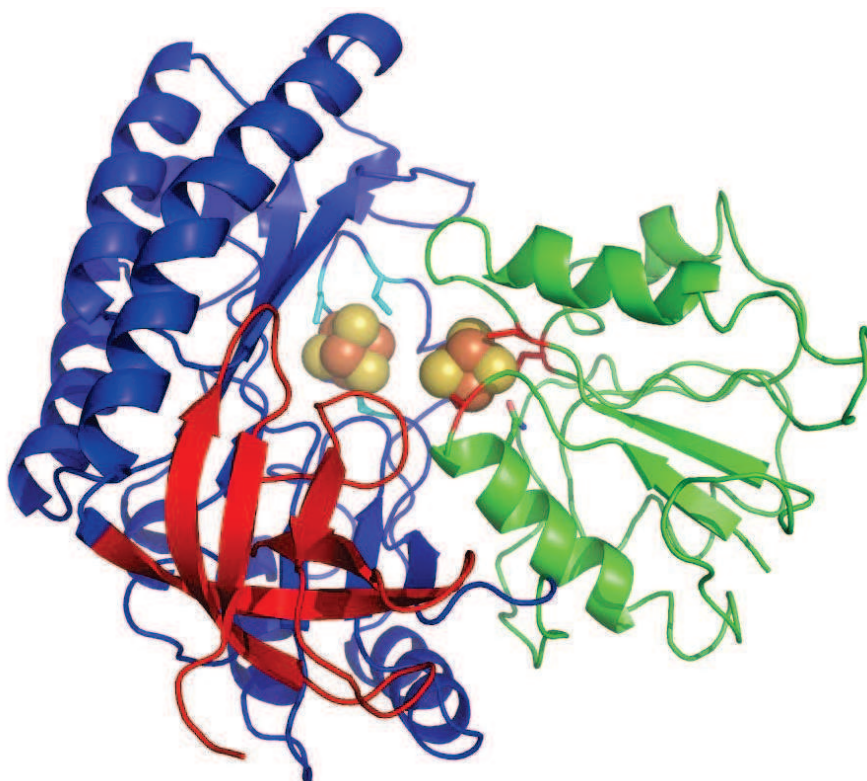


Figure II-1-1-2-A : Structure cristallographique de l'holo-RimO avec ses deux centres $[4\text{Fe-4S}]$. Les trois domaines de RimO sont représentés selon le code couleur suivant avec le domaine N-terminal UPF0004 en vert, le domaine Radical-SAM en bleu et le domaine en C-terminal TRAM en rouge.

Groupe d'espace	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Paramètres de cellule (Å)	
a, b, c (Å)	59,72 ; 86,95 ; 172,79
α, β, γ (°)	90, 90, 90
Coefficient de Matthews <input type="checkbox"/>	2.28
Qualité des données:	
Longueur d'onde (Å)	0.979
Résolution (Å)	3,0-3,4
R _{sym} (%)	13.6 (40.7)
Nombre de réflexions unique	11,965
Nombre de reflections Rfree set	994
Redondance significative	4.9 (4.3)
Complétude, globale (%)	91.4 (87.0)
Complétude, I \geq 2 σ _I (%)	75.7 (68.0)
I/ σ _I	13.7 (3.2)
Affinements (f\geq2σ_f):	
R _{free} (%)	24.8
R _{work} (%)	30.2
Qualité du model:	
Rmsd des longueurs de liaison (Å)	0.011
Rmsd des angles de liaison (°)	1.30
Distribution Ramachandran :	
Centre (%)	75.5
Autorisé (%)	23.0
Toléré généreusement(%)	0.9
Non autorisé (%)	0.6
Facteur B (Å ²)	65.0
Model Contents:	
Protomères par unité asymétriques	2
Résidus de la protéine	A&B: 2-432
Ligands	
Nombre d'atomes:	6980
Protéine	6938
Ion Métallique	16
Sulfure	26
Molécules d'eau	0

Tableau II-1-1-2 : Paramètres structuraux des cristaux d'holo-RimO de *T. maritima*.

Ces deux centres permettent de définir comme site actif de l'enzyme la région située entre eux. De manière surprenante, cette région présente une densité électronique joignant les deux centres [4Fe-4S]^{2+/+}. Cette densité est visible sur la Figure I-1-1-2-B sous la forme de points jaunes. Cette densité électronique a été modélisée par une chaîne de 5 atomes de soufre dont les extrémités sont coordonnées aux fers différenciés des centres [Fe-S]. La présence de ce polysulfure à 5 chaînons dans le site actif de l'holo-RimO montre que l'enzyme peut stocker du soufre, en accord avec le dosage de soufre des nouvelles préparations.

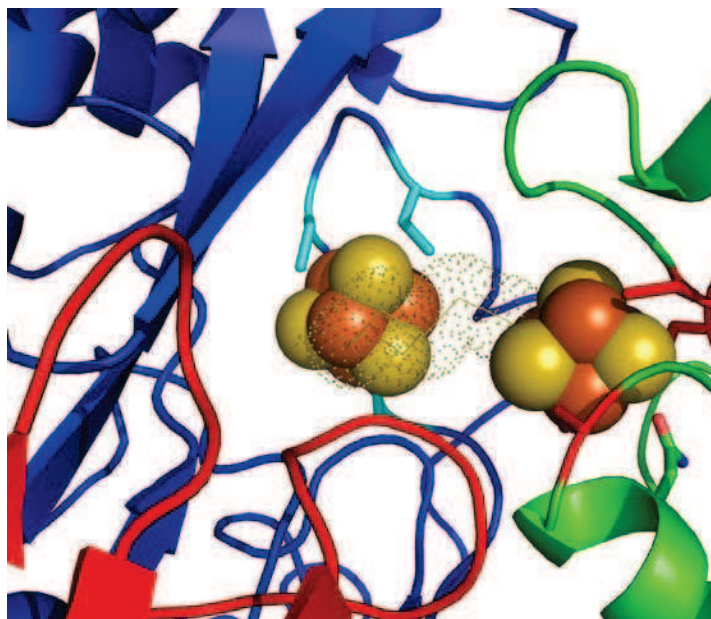


Figure I-1-1-2-B : Vue rapprochée du site actif montrant une densité électronique (point jaune) entre les centres $[4\text{Fe-4S}]$. Cette densité a été modélisée par un polysulfure de 5 atomes de soufre liant les deux centres $[4\text{Fe-4S}]$.

Cette structure cristallographique montre que l'holo-RimO peut stabiliser des espèces polysulfures et vient donc conforter notre hypothèse de travail qui postule que le cluster du « site soufre » a la capacité de fixer et/ou d'activer des espèces soufrées.

Enfin, cette structure met en évidence que la chaîne latérale de l'asparagine 13 (en vert avec l'oxygène terminal en rouge et l'azote en bleu sur la figure I-1-1-2-B se situe à environ 3 Å d'un des atomes de fer du centre $[4\text{Fe-4S}]$ du « site soufre ». La résolution de cette structure étant faible, il n'est pas possible de dire si ce fer est pentacoordiné.

II-1-1-3) Activité de l'holo-RimO.

Le test d'activité de RimO (M&M III-12-4) a été modifié pour permettre de suivre en une seule analyse la formation de tous les produits de la réaction. Une cinétique a été réalisée à une température d'incubation de 65°C pendant 1 h ($[\text{RimO}] = 1 \mu\text{M}$, $[\text{SAM}] = 150 \mu\text{M}$, $[\text{Peptide}] = 15 \mu\text{M}$, $[\text{dithionite}] = 5 \text{ mM}$). Dans ces conditions un seul produit monothiométhylé est détecté par HPLC et l'enzyme réalise au maximum 2-3 cycles catalytique (Fig II-1-1-3). La consommation du substrat (♦) au cours du temps (0,45 nmoles) est en accord avec la production (0,4 nmoles) de produit thiométhylé (×). Les quantités de SAH (○) et

d'AdoH (\square) sont respectivement 2,5 et 6.5 fois plus importantes que la quantité de produit thiométhylé. Ces découplages importants ont déjà été constatés précédemment (Chap I-6-3).

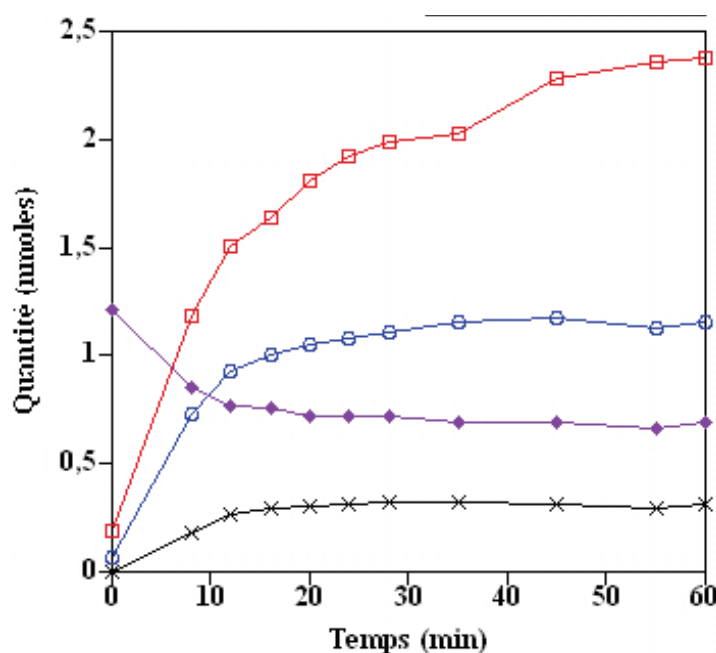


Figure II-1-1-3 : Analyse des produits et sous-produits de la réaction sur colonne C3 par HPLC. Un test d'activité a été réalisé dans les conditions suivantes : [RimO]= 1 μ M, [SAM]= 150 μ M, [peptide]= 20 μ M, [Dithionite]= 5 mM avec le peptide (\diamond), le peptide thiométhylé (\times), la SAH (\circ) et AdoH (\square).

Un test d'activité a également été réalisé en présence de quantités croissantes de sulfure de sodium dans les conditions suivantes ([RimO] = 1 μ M, [SAM] = 150 μ M, [peptide] = 20 μ M, [dithionite] = 5 mM). Dans cette expérience, le nombre de cycles catalytiques mesuré est de 5 en présence de 2 mM de sulfure (résultats non montrés).

En absence de substrat, l'holo-RimO incubée en présence de SAM et en absence de dithionite conduit à la formation de 0,25 SAH par monomère. Cette quantité atteint 2.64 en présence de dithionite. La production de SAH en absence de substrat a également été mentionnée dans une étude sur la protéine RimO d'*E. coli* (88).

En parallèle avec cette étude, nous avons étudié la protéine MiaB. En effet, la protéine MiaB de *T. maritima* est étudiée depuis longtemps au laboratoire et un grand nombre de mutants ont été créés permettant une étude mécanistique approfondie de l'enzyme. Cette étude de la protéine MiaB a été réalisée avec le Dr. Etienne Mulliez.

II-1-2) Etude du mécanisme réactionnel de MiaB.

II-1-2-1) Amélioration de la préparation de MiaB.

Dans le dernier article publié sur MiaB (71), l'holoenzyme est purifiée par chromatographie sur colonne Q-Sépharose HiTrap. Dans notre étude nous avons repris le protocole décrit pour RimO (Chapitre 1) qui, à la différence de celui d'Hernandéz, utilise une colonne NAP-25 pour purifier l'holoenzyme. Les coefficients d'extinction molaire des formes apo et holo ont été calculés à partir de la concentration exacte des protéines établie par dosage des acides aminés et montrent un écart important entre les deux formes. Le coefficient d'extinction molaire de l'apo-MiaB est de $65 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ alors que celui de l'holo-MiaB est de $95 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau ci-dessous (Tableau II-1-2-1).

	Point isoélectrique théorique	masse moléculaire (Da)	$\epsilon_{\text{Apo } 280\text{nm}}$ Théorique ($\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	$\epsilon_{\text{Apo } 280 \text{ nm}}$ ^{mesuré} ($\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	$\epsilon_{\text{Holo } 280 \text{ nm}}$ ^{mesuré} ($\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
MiaB	8.61	50 742,4	53 205	65 000	95 000

Tableau II-1-2-1 : Caractéristiques physico-chimiques théoriques (pI, masse moléculaire) et expérimentales de la protéine MiaB de *T. maritima*. Les paramètres théoriques sont obtenus par le logiciel ProtParam (serveur Expasy). Les coefficients d'extinction molaire sont calculés à partir d'une corrélation entre absorbance à 280 nm et concentration exacte de la protéine déterminée par quantification des acides aminés par HPLC sur colonne échangeuse d'ions.

La préparation d'holo-MiaB a été analysée sur colonne Superdex 75 en conditions anaérobies (boîte à gants avec $[\text{O}_2] < 2 \text{ ppm}$) équilibrée en tampon Tris-Cl 100 mM pH 8, KCl 100 mM (1 mL/min). La colonne Superdex 75 analytique est calibrée avec des marqueurs protéiques. Le temps d'élution de la forme majoritaire de la protéine MiaB (21 min) correspond à la masse du monomère d'après la calibration de la colonne. Le chromatogramme (Fig II-1-2-1) révèle la présence de formes oligomériques éluant en deçà de la forme monomérique. Lorsque la protéine est chauffée à 65°C pendant 1h en présence de 10 mM de DTT, la proportion de monomère augmente de manière significative (Fig II-1-2-1).

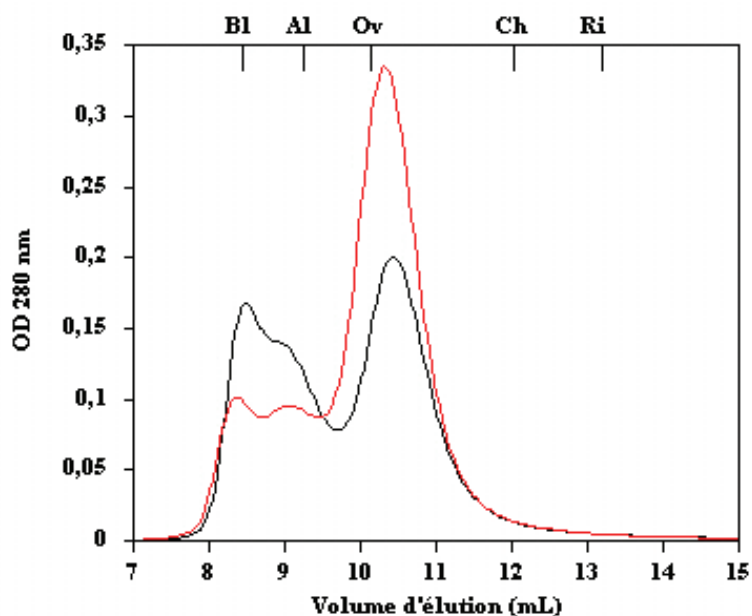


Figure II-1-2-1 : Comparaison des deux modes de préparation de l'holo-MiaB. Holo-MiaB (12 nmoles) est analysée sur colonne Superdex 75 après reconstitution (courbe noire) et après incubation avec 10 mM de DTT pendant 1h à 65°C. Marqueurs de poids moléculaire : Bleu Dextran (8,53 mL, BI), Albumine (67 000 Da; 9,4 mL, Al), Ovalbumine (43 000 Da; 10,3 mL, Ov), Chymotrypsinogène A (25 000 Da; 12,2 mL, Ch), Ribonucléase A (13 700 Da; 13,46 mL, Ri).

Le dosage du fer et du soufre inorganique montre que la protéine contient $8,5 \pm 0,3$ atomes de fer et 12 ± 1 de soufre par monomère après ce traitement. Un dosage du soufre S^0 par cyanolyse de l'enzyme en conditions dénaturantes et sous anaérobiose révèle la présence de 1,5 atome de S^0 par monomère. Ce dosage de S^0 a été validé avec une ferrédoxine contenant un centre [4Fe-4S] qui s'est avérée contenir 0,1 atome de S^0 par monomère de ferrédoxine.

Ce type de préparation a été utilisé pour l'ensemble des études mécanistiques qui suivent.

II-1-2-2) Le test d'activité de MiaB.

Le test d'activité de la protéine MiaB est adapté de celui décrit par le Dr. Fabien Pierrel dans sa thèse. L'holo-MiaB (0,5-10 μ M) dans un volume final de 100 μ L est incubée à 65°C pendant des durées variables, en présence de 2,5 mM de dithionite, de 150 μ M de SAM et de 30 à 50 excès molaires d'ARNts d'*E. coli* enrichis en ARNt^{Phe} (60-80%) (M&M III-13). La réaction est arrêtée soit par exposition de l'échantillon à l'air, soit par ajout de formiate 3 M, pH : 4.3.

Pour analyser les produits de la réaction, les ARNts du mélange réactionnel sont digérés par la nucléase P1 (M&M III-14-1) puis déphosphorylés avec la phosphatase alcaline. Les nucléosides obtenus sont analysés par HPLC sur colonne C18 (M&M III-14-2). Un chromatogramme type (Résultats, Figure II-1-2-2), permet d'identifier la SAM (4 min), la SAH (24 min), AdoH (32 min), MTA (38 min) et les nucléosides cytidine (C, 7 min), uridine (U, 10 min), inosine (I, 19 min), guanosine (G, 20 min), adénosine (A, 27 min) et les deux nucléosides modifiés i^6A , (48 min) et ms^2i^6A , (54 min) (Fig II-1-2-2). Les petits pics supplémentaires visibles sur le chromatogramme correspondent aux autres nucléosides modifiés (92).

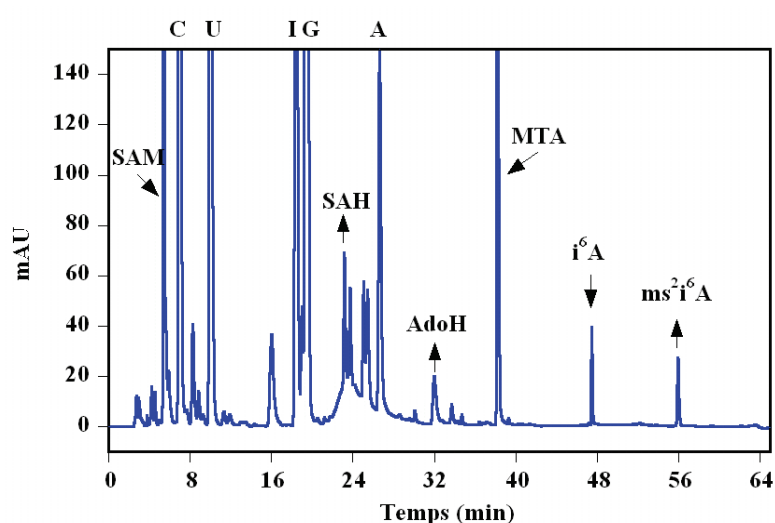


Figure II-1-2-2 : Chromatogramme type du milieu réactionnel après réaction. La SAM et i^6A sont consommés (flèche descendante) tandis que la SAH, AdoH et ms^2i^6A sont produits au cours de la réaction (flèche ascendante). Selon le temps de la réaction à 65°C et de la digestion des ARNt à 37°C, la quantité d'adénine varie et sort sous la forme d'un pic très large (22-26 min).

Pour stimuler l'activité enzymatique le Dr. F Pierrel avait, au cours de sa thèse, testé différents co-substrats soufrés. Seul, le sulfure augmentait légèrement la quantité de produit formé. Ce résultat, ainsi que la présence d'une chaîne polysulfure dans la structure de l'enzyme jumelle RimO, nous a incité à étudier son effet sur l'activité de MiaB.

II-1-2-3) Activité catalytique de MiaB.

L'activité de l'holo-MiaB a été étudiée en absence et en présence de sulfure en fonction de la concentration en enzyme (Fig II-1-2-3). Le milieu réactionnel contient du tampon Tris-Cl 100 mM pH 8, KCl 100 mM, le dithionite de sodium, 2.5 mM, la SAM, 150

μM et le substrat tRNA^{Phe} $50 \mu\text{M}$. En absence de sulfure, l'enzyme réalise jusqu'à 5 cycles catalytiques (Fig II-1-2-3). En présence de $500 \mu\text{M}$ de sulfure de sodium, on obtient $12\text{-}17 \text{ ms}^2\text{i}^6\text{A}$ par monomère. Il est important de noter que, dans ces conditions, l'activité de MiaB chute drastiquement au delà de $1 \mu\text{M}$ d'enzyme. Ces résultats sont importants puisqu'ils montrent pour la première fois que MiaB présente une activité catalytique significative *in vitro*.

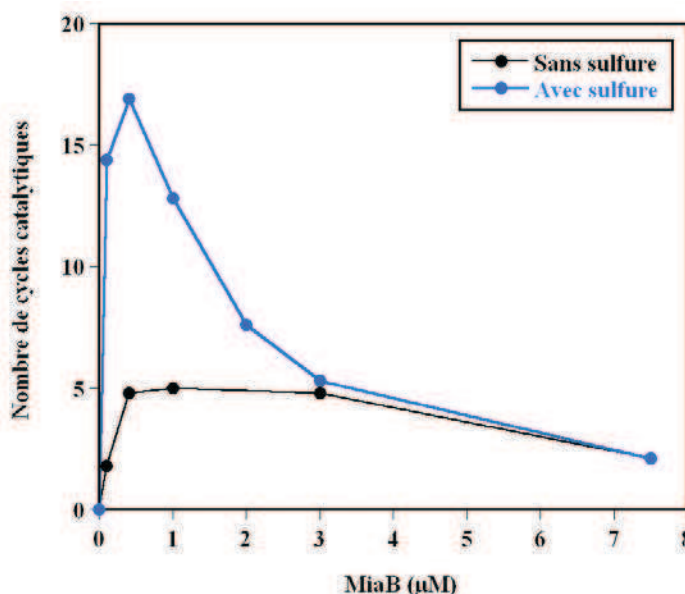


Figure II-1-2-3 : Activité de l'holo-MiaB en absence et en présence de sulfure. L'holo-MiaB ($0,2\text{-}7,5 \mu\text{M}$) est incubée en anaérobiose 60 min à 65°C dans un volume final de $100 \mu\text{L}$ en absence (noir) ou en présence (bleu) de $500 \mu\text{M}$ de sulfure de sodium, $2,5 \text{ mM}$ de dithionite et $50 \mu\text{M}$ d' ARNt^{Phe} (65-85% pure).

II-1-2-4) Activité de l'holo-MiaB en présence de sélénium.

Il a été précédemment montré qu'une préparation d'holo-MiaB contenant des centres $[4\text{Fe-4Se}]$ conduisait à la formation du produit sélénié $\text{mse}^2\text{i}^6\text{A}$ (70). Compte tenu des résultats obtenus avec l'ajout de sulfure, un test d'activité a été réalisé en présence d'un excès de sélénium ($[\text{Se}^{2-}] = 500 \mu\text{M}$). Dans ces conditions, $\text{mse}^2\text{i}^6\text{A}$ est très largement majoritaire (>99%) et $\text{ms}^2\text{i}^6\text{A}$ est produit à l'état de traces. Chacun de ces produits possède un temps d'élution et un spectre UV-Vis qui lui est propre (Fig II-1-2-4). La présence de $\text{mse}^2\text{i}^6\text{A}$ démontre que le sélénium est utilisé lors de la catalyse enzymatique.

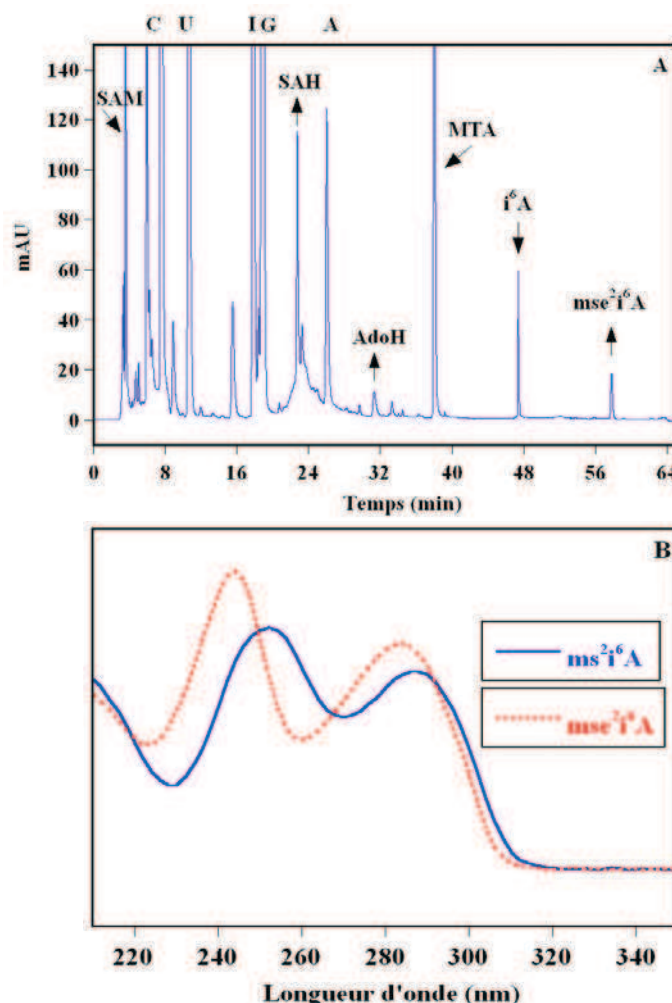


Figure II-1-2-4 : Chromatogramme du milieu réactionnel sur colonne C18 par HPLC (A) et spectre UV-vis de ms^{2,6}i⁶A (noir) et mse^{2,6}i⁶A (rouge) (B). L' holo-MiaB (1 μ M), est incubée en anaérobiose 60 min à 65°C en présence de sélénure (500 μ M), de dithionite de sodium (2,5 mM) et d'ARNt^{Phe} (40 μ M).

II-1-2-5) Cinétique des produits et sous-produits de la réaction en présence de sélénure.

Une cinétique avec MiaB en présence d'ARNt^{Phe} et de sélénure (Fig II-1-2-5) montre que la formation de mse^{2,6}i⁶A (♦) est très majoritaire par rapport à la quantité de ms^{2,6}i⁶A (■) et ce, dès le début de la réaction (2 min). De plus, cette cinétique montre que la formation de mse^{2,6}i⁶A est linéaire pendant les 6 premières minutes de la réaction enzymatique. La quantité d'i⁶A (●) consommée au cours de la réaction est en accord avec la quantité de produit formé (Fig II-1-2-5). Le nombre de cycles catalytiques réalisé par MiaB en présence de sélénure est proche de 12. La formation presque exclusive de mse^{2,6}i⁶A ne permet pourtant pas d'exclure que le sélénure inséré dans le substrat puisse résulter d'un échange très rapide avec les soufre pontants du centre [4Fe-4S].

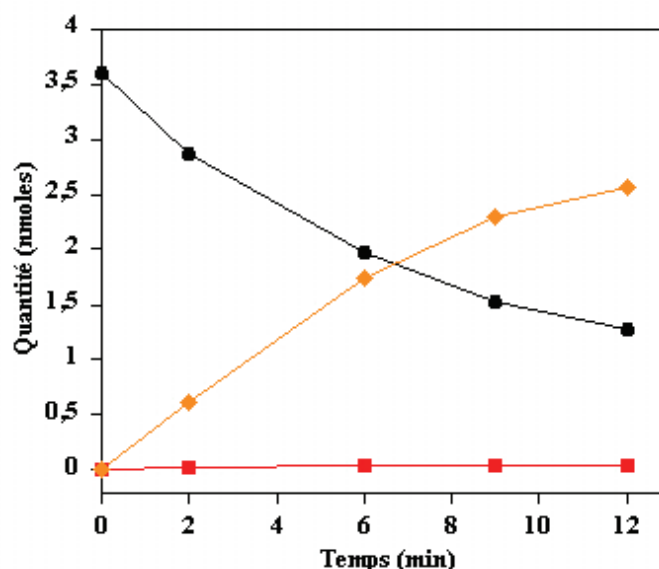


Figure II-1-2-5 : Cinétique de formation des produits et sous-produits de la réaction catalysée par l'holo-MiaB en présence de sélénure. La formation des produits mse^2i^6A (◆) et ms^2i^6A (■) est corrélée avec la consommation de i^6A (●). Le test enzymatique est réalisé avec $[MiaB] = 2,15 \mu M$, $[SAM] = 150 \mu M$, $[Dithionite] = 2,5 mM$, $[Se^-] = 500 \mu M$.

Cependant, cette cinétique montre que, s'il y a échange, celui-ci doit être très rapide puisqu'après 2 minutes, 90 % du produit de la réaction est sélénié (mse^2i^6A). Ce résultat est par contre en accord avec l'hypothèse d'un centre $[4Fe-4S]$ capable de lier le chalcogénure co-substrat.

II-1-2-6) Spectroscopie RPE de MiaB en présence de sulfure.

La réduction des centres $[4Fe-4S]$ de l'holo-MiaB par le dithionite de sodium (10 excès molaire) est suivie par spectroscopie UV-vis en boîte à gants puis la solution protéique est congelée et analysée par spectroscopie RPE en bande X. Dans ces conditions il est rapporté dans la littérature qu'il se forme 1,1 spin par monomère (71). Cette quantification prend en compte le signal $S = 1/2$ (0,9 spin) et le signal $S = 3/2$ (0,2 spin). La réduction des centres $[4Fe-4S]$ des enzymes Radical-SAM n'est jamais complète et le fait d'obtenir 1,1 spin par monomère suggère la présence de deux centres $[4Fe-4S]$ partiellement réduits (71).

La Figure II-1-2-6 montre les spectres RPE en bande X de holo-MiaB sans ajout de sulfure (A), avec 2 (B) et 20 (C) excès molaires de sulfure (Fig II-1-2-6). L'ajout de sulfure modifie le signal RPE de l'holo-MiaB et ce, dès l'addition de seulement 2 excès. Lorsque l'on

ajoute 20 excès de sulfure, la modification du signal est encore plus importante. Dans les trois conditions examinées, la quantité de spin reste à peu près constante (Fig II-1-2-6 (C)). En définitive, ces expériences montrent que le sulfure modifie le spectre RPE de l'holo-MiaB. Cependant, une modification du spectre RPE ne signifie pas forcément une coordination directe du sulfure sur un centre $[4\text{Fe-4S}]^+$ (Etienne Mulliez, communication personnelle). De plus, on ne peut exclure un échange rapide entre les soufre pontants du centre $[4\text{Fe-4S}]^+$ du « site soufre » avec le sulfure en solution. Il est important de noter que les concentrations utilisées en RPE sont 100 fois plus importantes que celles du test d'activité.

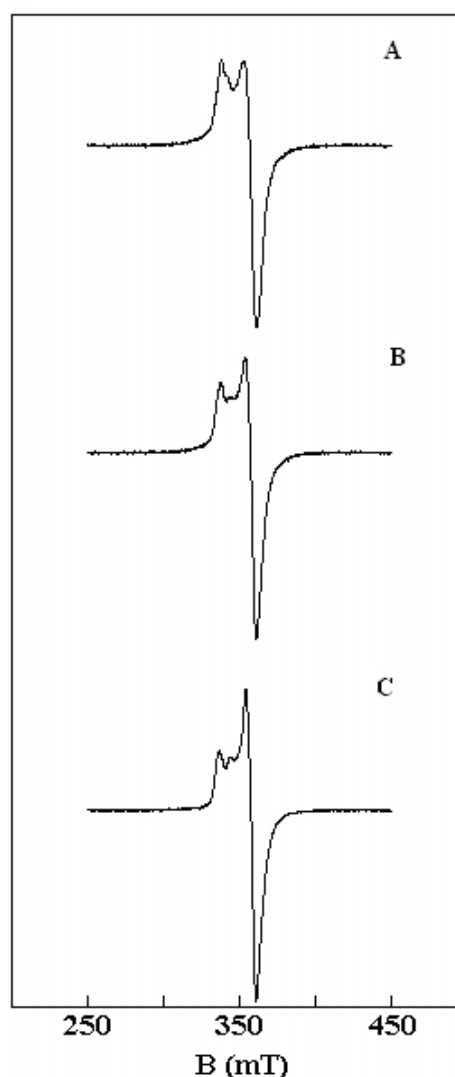


Figure II-1-2-6 : Spectres RPE en bande X de holo-MiaB en conditions réductrices en fonction de la présence de sulfure. Trois conditions ont été testées : MiaB seule (430 μM , 360 μM spins) (A), MiaB avec 2 équivalents de sulfure de sodium (430 μM , 365 μM spins) (B) et MiaB avec 20 équivalents de sulfure de sodium (430 μM , 380 μM spins) (C). Les conditions d'enregistrement de ces spectres sont les suivantes : Puissance : 25 μW ; Température 10 K; gain 10^5 ; Amplitude 10 G; Fréquence: 9,65 GHz.

II-2) Etude mécanistique.

On a vu précédemment que le sulfure et le sélénure sont des co-substrats utilisés par MiaB. Après réflexion sur la nature de l'espèce active au sein des MTTases, il est apparu que si cette espèce était un soufre terminal coordonné au site soufre, alors il était possible que celui-ci soit méthylé avant d'être inséré dans le substrat. Les MTTases réalisant l'insertion d'un groupement thiométhyle, nous nous sommes posés la question de savoir si MiaB était capable d'utiliser le méthylthiolate (CH_3S^-) comme substrat.

II-2-1) Activité de MiaB en présence de CH_3SNa .

Nous avons vu précédemment que, dans les conditions de catalyse, l'holo-MiaB produit environ $1,1 \pm 0,1$ AdoH et $3 \pm 0,2$ SAH par $\text{ms}^2\text{i}^6\text{A}$. Un test enzymatique avec l'holo-MiaB pendant 1h à 65° a permis de déterminer l'activité maximale de MiaB en fonction de la concentration en CH_3SNa (Fig II-2-1). Ce graphe montre que l'activité augmente légèrement pour des concentrations comprises entre 2 et 20 mM de CH_3SNa . Une activité maximale de 5,6 cycles catalytiques par monomère est obtenue en présence de 5 mM de méthylthiolate.

Cependant, l'information capitale révélée par ce graphe est une corrélation inverse entre le produit de la réaction ($\text{ms}^2\text{i}^6\text{A}$) et la formation de SAH. Ainsi, à une concentration de 5 mM de CH_3SNa , la quantité de SAH produite est de 0,1 nmoles alors que la quantité de $\text{ms}^2\text{i}^6\text{A}$ détectée est de 0,38 nmoles. Cette expérience suggère que l'enzyme a utilisée 0,1 nmoles de soufre et que ce soufre a été méthylé par la SAM en libérant 0,1 nmoles de SAH pour former au final 0,1 nmoles de $\text{ms}^2\text{i}^6\text{A}$. Le $\text{ms}^2\text{i}^6\text{A}$ restant (0,28 nmoles), soit environ 75 % du produit de la réaction, provient du transfert du CH_3S^- exogène. Ce bilan réactionnel laisse entendre que l'enzyme est capable d'utiliser le méthylthiolate (CH_3S^-) comme substrat.

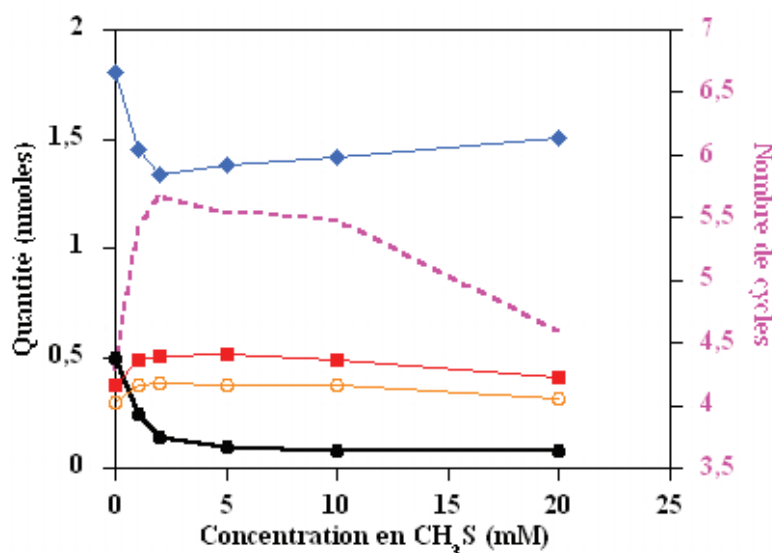


Figure II-2-1 : Formation des produits et sous-produits de la réaction catalysée par holo-MiaB en présence de CH_3S^- . Les produits présents dans le milieu réactionnel sont : SAH (●), AdoH (■), $i^6\text{A}$ (◆) et ms^2i^6A (○) et le nombre de cycles catalysés (---). Les conditions de la réaction sont les suivantes : 0,7 μM d'holo-MiaB, 24,7 μM d'ARNt^{Phe}, 150 μM de SAM et 2,5 mM de dithionite.

Pour confirmer que le soufre inséré lors de la catalyse ne provient pas du centre [4Fe-4S] du site soufre, nous avons répété cette expérience avec du méthylsélénate (CH_3Se^-). De cette manière, il doit être possible de distinguer le soufre présent dans le site actif qui devrait mener à la formation ms^2i^6A et le méthylsélénate exogène qui devrait conduire à la formation de mse^2i^6A .

II-2-2) Activité de MiaB en présence de CH_3SeNa .

Dans cette expérience, l'activité de l'holo-MiaB (0,05 nmoles) est testée en présence de méthylsélénate ($[\text{CH}_3\text{SeNa}] = 1 \text{ mM}$) (Fig II-2-2). Le contrôle positif de l'expérience est réalisé en présence de sulfure ($[\text{S}^{2-}] = 500 \mu\text{M}$). L'analyse des produits de la réaction (Fig II-2-2 (B)) par HPLC montre qu'en présence de CH_3SeNa le produit majoritaire est mse^2i^6A (56 min) accompagné d'une petite quantité de ms^2i^6A (54 min) validé par le contrôle positif en présence de sulfure (noir).

La cinétique présentée en Figure II-2-2-A, montre que l'holo-MiaB catalyse la production de 0,05 nmoles de ms^2i^6A (●) et de 0,46 nmoles de mse^2i^6A (■). Ces quantités de produits correspondent à 1 ms^2i^6A et 9 mse^2i^6A par monomère d'holo-MiaB. La même préparation d'holo-MiaB en présence de sulfure réalise un peu plus de 10 cycles catalytiques

(●) en 15 minutes correspondant à peu près à la somme des produits formés (ms^2i^6A et mse^2i^6A) en présence de CH_3SeNa (Fig II-2-1).

La cinétique observée en présence de CH_3SeNa montre que l'enzyme présente la même activité quelque soit la nature chimique du chalcogène proposé (sélénure ou methylselenate). L'ensemble de ces résultats confirme que l'enzyme catalyse la methylthiolation du substrat sans utiliser les soufres pontants du cluster $[4Fe-4S]$ du site soufre.

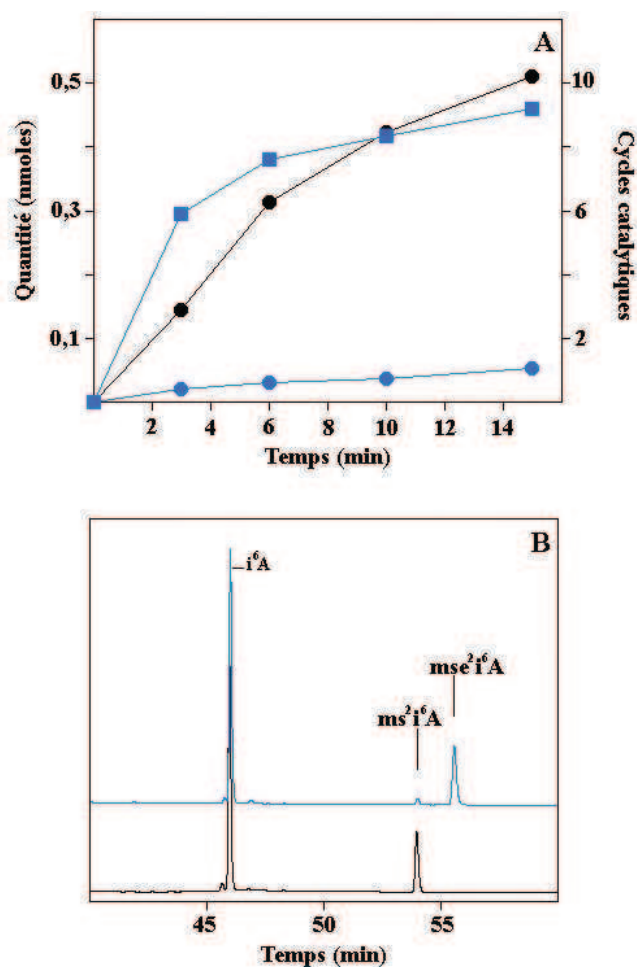


Figure II-2-2 : Cinétique de formation (A) et profil HPLC (B) de ms^2i^6A et mse^2i^6A dans la réaction de MiaB. (A) Cinétique de la formation de ms^2i^6A (●) en présence de sulfure de sodium. Cinétique de formation de ms^2i^6A (●) et de mse^2i^6A (■) catalysés par l'holo-MiaB en présence de CH_3Se^- . Conditions de la réaction : 0,5 μM de MiaB, 25 μM d'ARNt (15 μM i^6A), 2,5 mM de dithionite de sodium et 0,5 M de sulfure de sodium ou 1 mM de CH_3Se^- en tampon Tris-Cl 25 mM pH 8, KCl 25 mM. La réaction est initiée par l'ajout de 150 μM de SAM. (B) Profil HPLC de l'analyse des nucléosides modifiés i^6A , ms^2i^6A , mse^2i^6A de la réaction décrite en (A) en présence de Na_2S (noir) et en présence de CH_3SeNa (bleu).

Cette expérience marque un tournant dans la manière de concevoir l'insertion de soufre par voie radicalaire. Afin de pouvoir démontrer l'existence d'un intermédiaire dans lequel $\text{CH}_3\text{S}^-/\text{S}^-$ est coordonné au centre $[\text{4Fe-4S}]$ du site soufre, nous avons étudié cette réaction par spectroscopie HYSCORE qui est la technique de choix pour étudier les faibles couplages hyperfins entre un centre $[\text{4Fe-4S}]^+$ paramagnétique et un atome possédant un spin nucléaire. L'apparition d'un couplage n'apparaît que si les deux entités sont relativement proches ($< 6\text{\AA}$) (M&M V-2).

Afin de simplifier au maximum les spectres HYSCORE, nous avons choisi de travailler avec le mutant MiaB-3M contenant un motif $\text{AX}_3\text{AX}_2\text{A}$ à la place du motif Radical-SAM et qui donc ne possède que le centre $[\text{4Fe-4S}]$ du site soufre.

II-3) Etude spectroscopique HYSCORE de la protéine MiaB.

II-3-1) Spectroscopie HYSCORE de protéine MiaB-3M.

La caractérisation de cette enzyme par spectroscopie RPE a été rapportée avant mon arrivée au laboratoire (71). Cependant aucune caractérisation par spectroscopie HYSCORE n'avait été entreprise. Après reconstitution du centre $[\text{4Fe-4S}]$ de la protéine MiaB-3M en boîte à gants, l'holo-MiaB-3M est réduite par le dithionite de sodium puis la solution protéique est analysée par spectroscopie HYSCORE. L'analyse du spectre obtenu (Fig II-3-1) révèle la présence d'une tache de corrélation (Tache de corrélation verte, Fig II-3-1) attribuée à un azote faiblement couplé au centre $[\text{4Fe-4S}]^+$. Ce résultat suggère la présence d'un azote proche du centre paramagnétique mais probablement pas coordonné à ce centre.

II-3-2) Spectroscopie HYSCORE de la protéine MiaB-3M-N13C.

Afin de démontrer que le couplage observé par spectroscopie HYSCORE de l'holo-MiaB-3M provient bien de l'asparagine 13, la mutation N13C a été introduite dans le gène codant pour la protéine MiaB-3M (M&M II-3). Après vérification de la séquence, la protéine MiaB-3M-N13C a été produite et purifiée. La reconstitution du centre [4Fe-4S], a conduit à l'holo-MiaB-3M-N13C qui a été analysée par spectroscopie HYSCORE (Fig II-3-2). Le spectre montre l'absence de taches de corrélation à la position observée pour le mutant 3M (Fig II-3-2). Ce résultat suggère que l'azote détecté dans le mutant 3M est bien celui de l'asparagine 13. Cependant, seule la structure tridimensionnelle de l'holo-MiaB-3M-N13C permettrait d'établir le rôle joué par cette mutation.

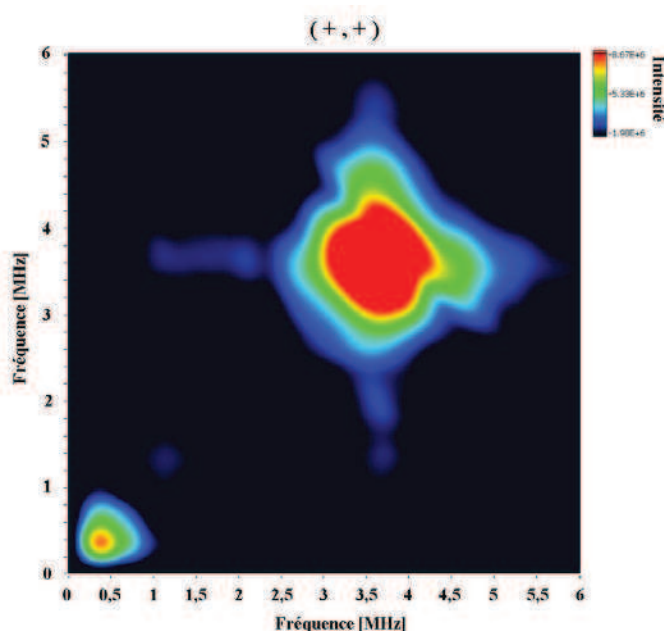


Figure II-3-2 : Spectre HYSCORE de l'holo-MiaB-3M-N13C dans le quadrant (+,+). L'holo-MiaB-3M-N13C (750 μ M) est réduite avec 8,7 mM de dithionite.

La structure de RimO montre l'asparagine 13 à 3 Å du centre [4Fe-4S] terminal. De plus la spectroscopie Mössbauer de cette enzyme après reconstitution ($[4\text{Fe-4S}]^{2+}$) a mis en évidence une paire Fe^{2+} - Fe^{3+} partiellement localisée attribuée à une possible pentacoordination d'un des Fe du centre. Il est probable que dans le cas de MiaB, protéine jumelle de RimO, l'asparagine 13 se trouve dans le même environnement et donc à l'origine du signal HYSCORE.

II-3-3) Spectroscopie HYSCORE de l'holo-MiaB-3M en présence de sulfure.

Nous avons étudié par HYSCORE la réaction de l'holo-MiaB-3M avec 12 mM de sulfure de sodium. La Figure II-3-3 montre les spectres HYSCORE obtenus en absence (A) et en présence (B) de sulfure. Comme vu précédemment, en absence de sulfure on observe deux taches de corrélation attribuées à l'asparagine N13. L'ajout de 12 mM de sulfure provoque la disparition de ces taches de corrélation indiquant la perte du couplage entre le centre $[4\text{Fe-4S}]^+$ du site soufre et l'azote de l'asparagine. Une interprétation possible de cette expérience est que le sulfure se coordonnerait sur le centre $[4\text{Fe-4S}]^+$ entraînant l'éloignement de l'asparagine et donc la perte du signal. Le soufre utilisé ne possédant pas de spin nucléaire aucune tache de corrélation n'est attendue même s'il est coordonné au centre $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$. Par contre l'utilisation de sulfure ($^{33}\text{S}^{2-}$, $S = 3/2$) permettrait de visualiser un couplage entre le sulfure et le centre $[4\text{Fe-4S}]^+$.

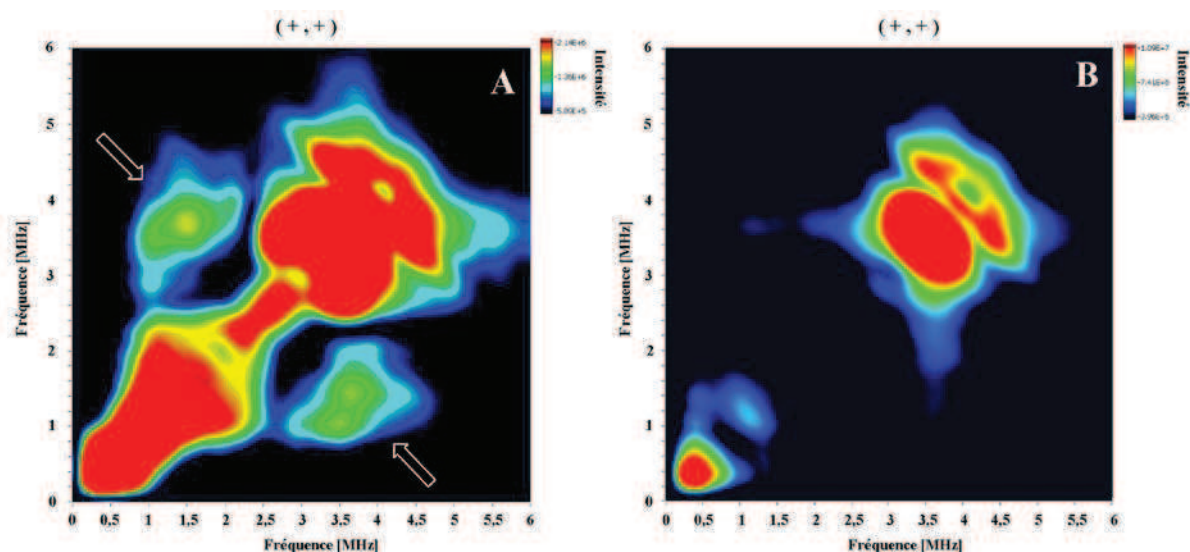


Figure II-3-3 : Spectre HYSCORE de l' holo-MiaB-3M dans le quadrant (+,+) en absence (A) et en présence (B) de sulfure)). L'holo-MiaB-3M (607 μM) est réduite avec 18 excès de dithionite puis 12 mM de sulfure de sodium sont ajoutés avant congélation.

Une autre possibilité consiste à réaliser des expériences HYSCORE avec du méthylsélénate enrichi en ^{77}Se (spin nucléaire $1/2$) ($\text{CH}_3^{77}\text{Se}^-$) et du méthylthiolate marqué sur le carbone ($^{13}\text{CH}_3\text{S}^-$).

II-3-4) Spectroscopie HYSCORE de la l'holo-MiaB-3M en présence de $\text{CH}_3^{77}\text{SeNa}$.

En Figure II-3-4 est montré le quadrant (+,+) du spectre HYSCORE de l'holo-MiaB-3M réduite (612 μM) puis incubée avec 10 équivalents de $\text{CH}_3^{77}\text{SeNa}$. Ce spectre montre la présence de deux taches de corrélation dont le couplage à 3,82 MHz indique qu'il s'agit d'un sélénium. D'autre part, l'absence de taches de corrélation correspondant à un azote confirme qu'en présence d'un ligand potentiel, ici le $\text{CH}_3^{77}\text{SeNa}$, le centre $[4\text{Fe-4S}]$ n'est pas en interaction avec l'atome d'azote de l'asparagine 13. Des calculs théoriques ont montré que la coordination d'un sélénure en position terminale sur un cluster $[4\text{Fe}_4\text{S}]$ conduirait à un couplage de 4-5 MHz en accord avec le couplage observé (JM Mouesca, communication personnelle).

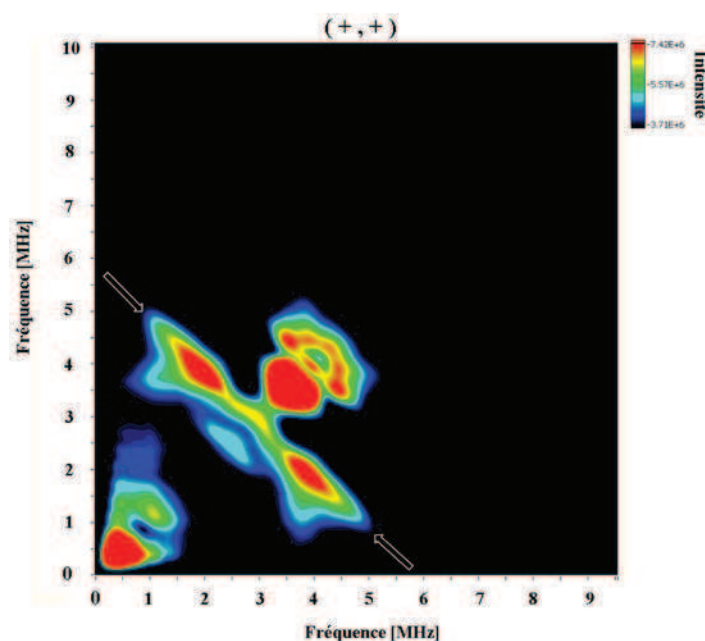


Figure II-3-4 : Spectre HYSCORE, quadrant (+,+) de la protéine MiaB-3M en présence de $\text{CH}_3^{77}\text{Se}^-$.

Le spectre HYSCORE de l'holo-MiaB réduite, contenant deux centres $[4\text{Fe-4S}]$, en présence de $\text{CH}_3^{77}\text{SeNa}$ montre les mêmes taches de corrélation suggérant que les conclusions tirées des expériences réalisées avec l'holo-MiaB-3M sont aussi valables pour l'holo-MiaB. En définitive, ces résultats indiquent que le $\text{CH}_3^{77}\text{Se}$ se coordine sur le centre $[4\text{Fe-4S}]$ du site soufre.

II-3-6) Spectroscopie RPE en bande X et HYSCORE de l'holo-MiaB en présence de SAM.

II-3-6-1) Spectroscopie RPE de l'holo-MiaB en présence de SAM.

Afin de compléter cette étude, la spectroscopie RPE de l'holo-MiaB a été réalisée en présence de la SAM. La Figure II-3-6, montre les spectres de l'enzyme en absence de SAM (bleu) et en présence de 10 mM de SAM (rouge). L'ajout de la SAM provoque une modification du signal RPE suggérant que la SAM se fixe à proximité d'un centre $[4Fe-4S]^+$. L'échantillon contenant de la SAM a été analysé par spectroscopie HYSCORE. Le spectre de l'holo-MiaB en présence de 8 excès de SAM ne montre aucune tache de corrélation. Ceci signifie qu'aucun atome n'est en interaction avec un des centres $[4Fe-4S]^+$ de l'holo-MiaB. Contrairement à la spectroscopie RPE, ce résultat établit sans ambiguïté que, dans ces conditions, la SAM n'est pas coordonnée au centre $[4Fe-4S]^+$.

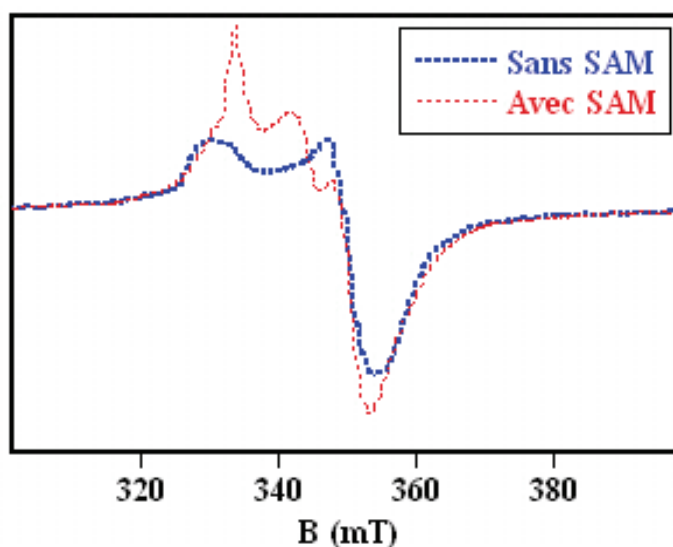


Figure II-3-6-1 : Spectres RPE en bande X de la protéine MiaB en absence (bleu) et en présence (rouge) de SAM. Holo-MiaB (260 μ M), 10 mM de SAM. Les spectres ont été enregistrés dans les conditions suivantes : Puissance: 10 mW, Fréquence: 9,44 GHz, Gain: 8×10^4 , Modulation du signal: 100 kHz; Amplitude de modulation: 1 mT.

Ce résultat nous a incité à refaire cette analyse dans les conditions de catalyse, c'est-à-dire en présence de SAM, de dithionite et d'ARNt, puisque dans ces conditions, l'enzyme étant active, ceci implique que la SAM puisse se coordonner au centre $[4Fe-4S]$ du site Radical-SAM.

II-3-6-2) Spectroscopie HYSCORE de l'holo-MiaB en présence de SAM et d'ARNt^{Phe}.

Le spectre HYSCORE de l'holo-MiaB obtenu dans des conditions de catalyse conduit à l'apparition de deux taches de corrélation dans le quadrant $(-, +)$ (Fig II-3-6-2). Ces deux taches de corrélation sont des doubles quantas (noté dq dq, Fig II-3-6-2) observées uniquement lorsqu'un azote est fortement couplé avec un centre $[4Fe-4S]^+$ (M&M IV-2).

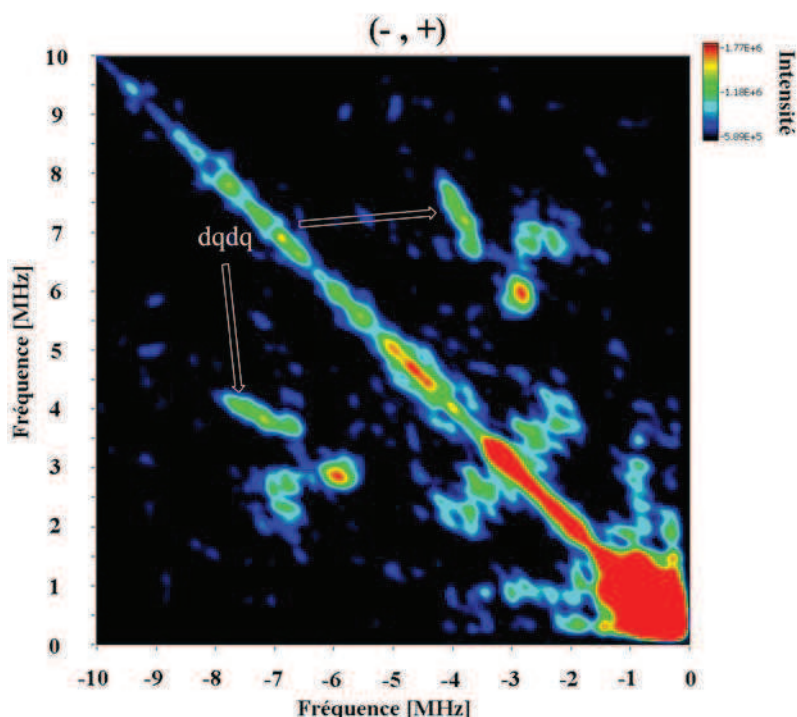


Figure II-3-6-2 : Spectre HYSCORE de l'holoenzyme MiaB en présence de SAM et d'ARNt^{Phe}.

Cette étude montre que la SAM modifie le signal RPE sans être coordonnée à un centre $[4Fe-4S]$ d'après l'analyse HYSCORE. Ce résultat a priori surprenant pourrait s'expliquer par l'existence de deux sites de fixation de la SAM au sein du site actif. L'un serait utilisé lors de la production du radical Ado^\bullet en présence du substrat alors que l'autre serait utilisé en absence du substrat pour la méthylation de l'espèce soufrée. Selon cette hypothèse, l'azote fortement couplé serait dû à la SAM fixée sur le centre $[4Fe-4S]^+$ du site Radical-SAM. Par contre, en absence du substrat, la fixation de la SAM sur le deuxième site impliqué dans la méthylation conduirait à la modification du signal RPE.

II-4) Méthylation en absence de substrat.

Des concentrations croissantes d'apo-MiaB (●), d'holo-MiaB (■) et d'holo-MiaB-N13C (◆) ont été incubées (20 min) en présence de SAM (150 µM) et de dithionite (2,5 mM) tampon Tris-Cl 0,1M, pH = 8, KCl 0,1 M. la forme holo-MiaB a aussi été incubée en présence de SAM uniquement (□). Le graphe présenté en Figure II-4-2 révèle que la production de SAH est dépendante de la quantité d'holo-MiaB (carré rouge et blanc). L'incubation de 1 nmole d'holo-MiaB en absence de dithionite génère 0,29 nmoles de SAH par monomère alors que 8,3 nmoles de SAH par monomère d'holo-MiaB sont produites en présence de dithionite. Ce résultat montre que, dans ces conditions, la SAM est activée. MiaB catalyse la méthylation d'une espèce inconnue conduisant à la formation d'environ 8 molécules de SAH par monomère d'holo-MiaB. Par contre, ni l'apo-MiaB ni l'holo-MiaB-N13C ne produisent de SAH.

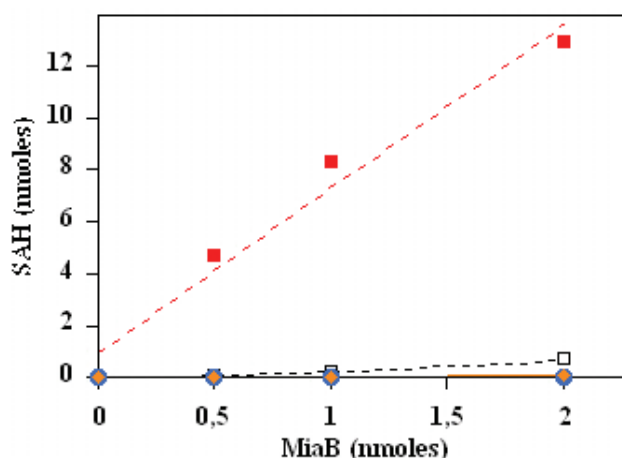


Figure II-4-1 : Production de SAH catalysée par l'holo-MiaB. (◆) La formation de SAH a été suivie à 3 concentrations différentes d'apo-MiaB (●), d'holo-MiaB (■) et d'holo-MiaB-N13C. Le test est réalisé en présence de 150 µM de SAM. Les symboles pleins se réfèrent aux réactions en présence de 2,5 mM de dithionite et les symboles vides en son absence. La régression linéaire avec les données obtenues pour l'holo-MiaB en présence de dithionite (■) est de $y = 0,92 + 6,32x$ ($r = 0,985$) et en absence de dithionite (□) de $y = -0,04 + 0,37x$ ($r = 0,992$).

Cette réaction de méthylation est dépendante de l'holo-MiaB et augmente en présence de dithionite mais n'est observable qu'en absence du substrat, c'est-à-dire lorsque la réaction de thiométhylation n'a pas lieu. Pour savoir si la protéine était covalamment méthylée, l'holo-MiaB a été incubée avec de la SAM (45 min à 65°C) en présence et en absence de dithionite. Le spectre de masse ESI-TOF a été ensuite enregistré. Dans les deux cas, la masse moléculaire obtenue est celle de l'apo-MiaB. Cette expérience montre que l'holo-MiaB n'est

pas méthylée de manière covalente. Des résultats similaires ont été obtenus avec l'holo-RimO incubée en présence de en présence/absence de dithionite. Le mutant RimO-N13C (M&M II-3) est inactif et ne produit pas de SAH.

II-5) Discussion.

La structure de l'holo-RimO a été obtenue par reconstitution des centres [4Fe-4S] en boîte à gants en présence de sulfure (S^{2-}) et de fer ferreux (Fe^{2+}). La faible résolution de la structure permet cependant de montrer la présence d'une chaîne de 5 atomes de soufre entre les deux centres [4Fe-4S] distants d'environ 8 Å. Cette structure permet de visualiser le site actif des MTTases et de circonscrire le lieu de la catalyse au niveau des centres [4Fe-4S]. Il s'agit de la première structure d'une thiométhyltransférase sous forme holo.

Les expériences réalisées en spectroscopie Mössbauer avec l'holo-RimO montrent la présence d'une paire différenciée Fe^{2+} - Fe^{3+} . Comme discuté dans la chapitre I, l'observation d'une paire différenciée pourrait s'expliquer par la coordination de l'atome d'oxygène de l'asparagine 13 sur un des atomes de fer du centre [4Fe-4S] du « site soufre ». La structure de l'holo-RimO montre que l'asparagine 13 est à 3 Å d'un Fe du centre [4Fe-4S] du « site soufre ». Ce résultat suggère que l'asparagine 13 possède un rôle dans la première ou dans la deuxième sphère de coordination d'un des Fe du centre [4Fe-4S] du « site soufre ». Concernant l'activité de l'enzyme, nos résultats montrent que l'ajout de sulfure dans le test d'activité de RimO permet de doubler la quantité de peptide mono-thiométhylé (de 2-3 à 5). Ils montrent aussi que la quantité d'AdoH produite est très supérieure à la quantité de produit thiométhylé détecté. Le test d'activité de RimO utilisant un peptide mimétique du substrat naturel, la protéine S12, et il est possible qu'une moins bonne reconnaissance de ce peptide soit responsable de ce découplage.

Lors de la réalisation de ces travaux sur la protéine RimO de *T. maritima*, un travail similaire a été publié par l'équipe de SJ Booker sur la protéine RimO de *E. coli* (88). Les résultats RPE et Mössbauer obtenus avec l'enzyme RimO d'*E. coli* sont proches de ceux obtenus avec la protéine RimO de *T. maritima*. Cependant, l'activité enzymatique de RimO de *E. coli* est plus faible (0,12 cycles catalytiques). Dans cet article, les auteurs proposent un mécanisme réactionnel dans lequel le substrat est activé par le radical 5'-désoxyadénosyle menant à la formation d'un radical-substrat (Figure II-5). Puis, sur la base des travaux réalisés

sur les autres systèmes d'insertion de soufre par voie radicalaire, deux chemins réactionnels hypothétiques sont proposés. Dans le premier cas, le radical substrat réagit avec un soufre pontant provenant du centre [4Fe-4S] du domaine UPF0004 conduisant à la destruction de ce centre et la libération du produit thiolé qui est alors méthylé bien que le cluster soit détruit (Fig II-5 (1)). Dans le deuxième cas, le radical-substrat réagit avec un soufre pontant du centre [4Fe-4S] mais la méthylation est réalisée en même temps que la dégradation du centre (Fig II-5 (2)). Ce mécanisme est en accord avec le faible nombre de cycles catalytiques réalisé par l'holo-RimO d'*E. coli* mais expliquerait difficilement des turnovers supérieurs à 1.

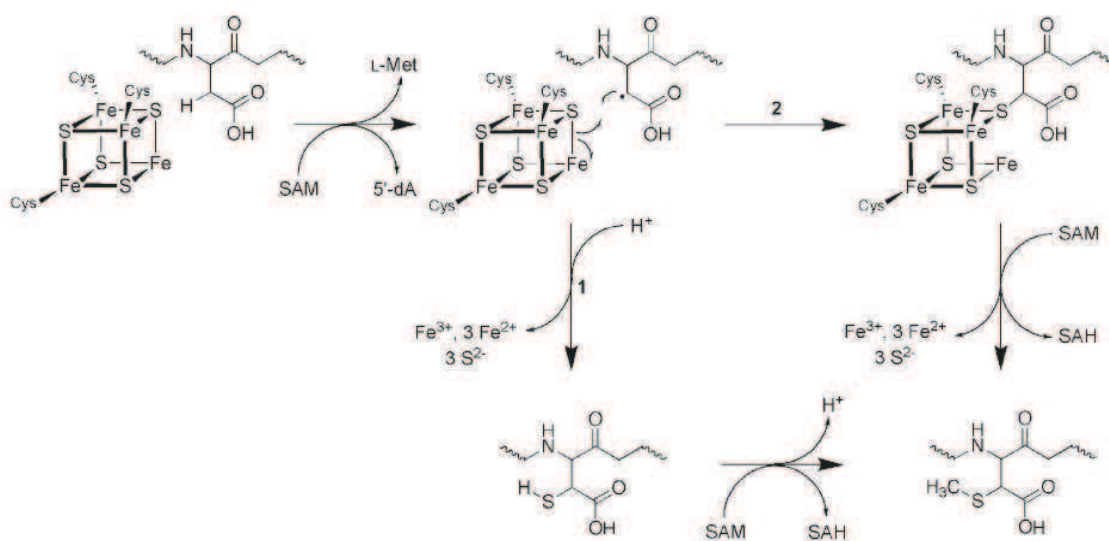


Figure II-5 : Mécanisme réactionnel de RimO d'*E. coli* proposé par Booker SJ (reproduit de Lee KH *et al.*, (88)).

Dans les expériences présentées dans ce chapitre, nous avons trouvé des conditions dans lesquelles holo-MiaB est capable de catalyser l'insertion de 12 à 17 atomes de soufre par monomère. Ce résultat marque un tournant important puisque, dans la littérature, les enzymes impliquées dans l'insertion du soufre par voie radicalaire n'effectuent au mieux que 3 cycles catalytiques *in vitro*.

L'ajout de sélénure dans le test enzymatique entraîne la production quasiment exclusive de $\text{mse}^{2+} \cdot 6\text{A}$, cependant un échange $\text{S}^{2-}/\text{Se}^{2-}$ conduisant à la formation d'un centre [4Fe-4Se] ne peut être exclu lors de la catalyse. Dans le cas de la biotine synthase, le groupe de Marquet *et al.* a montré que, en absence de substrat, les soufre pontants du centre [2Fe-2S] ne s'échangeaient pas avec le sélénure en excès. En revanche, dans les conditions de la

catalyse, l'excès de sélénure conduit à un mélange de centres [2Fe-2S] et [2Fe-2Se], identifiés par résonnance Raman (52).

L'activité de MiaB en présence de méthylthiolate (CH_3SNa) et de méthylsélénate (CH_3SeNa) montre que ces composés sont utilisés lors de la catalyse. De plus, le spectre HYSCORE obtenu en présence de $\text{CH}_3\text{Se}^{77}$ indique que ce composé est coordonné au centre [4Fe-4S] du site soufre.

En définitive ces résultats montrent que l'holo-MiaB n'utilise pas les soufres pontants du centre [4Fe-4S] du « site soufre » et qu'elle peut utiliser le méthylthiolate comme substrat. La structure de la (R)-2-hydroxyisocaproyle-CoA déshydratase obtenue par Knauer *et al.* (Voir Introduction) montre la présence unique d'un ligand sulfhydryle/sulfido coordonné au fer différencié d'un [4Fe-4S]. Ce centre est proposé comme « réservoir » d'électrons pour un deuxième cluster [4Fe-4S] situé à proximité et qui active le substrat ((R)-2-hydroxyisocaproyle-CoA). Dans le cas de RimO, la structure confirme l'affinité de ses clusters pour des espèces soufrées et vient conforter les résultats obtenus avec MiaB montrant la coordination de ces espèces sur le cluster du « site soufre ». D'un point de vue mécanistique, la coordination d'une espèce soufrée sur le centre [4Fe-4Fe] du « site soufre » pourrait favoriser son activation sous la forme d'une espèce soufrée radicalaire. L'ensemble de ces résultats montre que l'hypothèse généralement admise dans la littérature selon laquelle le soufre introduit dans le substrat provient de la destruction du centre [Fe-S] additionnel doit être abandonnée et permet de proposer différents mécanismes réactionnels que nous allons détailler.

II-6) Hypothèses mécanistiques.

II-6-1) Mécanisme proposé pour RimO.

Dans le cas de RimO l'insertion d'un groupe thiométhyle a lieu sur un carbone aliphatique ($-\text{CH}_2-$) en position β de l'aspartate 89 de la protéine ribosomale S12. Dans le mécanisme proposé, le centre Radical-SAM reconnaît la SAM par son extrémité aminocarboxylate. A l'état réduit, ce centre catalyse la réductolyse de la SAM conduisant à la formation du radical Ado^\bullet . Ce radical réagit avec un hydrogène présent sur le carbone

aliphatique β de la chaîne latérale de l'aspartate 89 de la protéine ribosomale S12 pour former un radical substrat noté R^\bullet (Fig II-6-1).

Une fois cet intermédiaire radicalaire généré, deux chemins réactionnels sont possibles. Soit ce radical couple avec une espèce radical thiyle $-S^\bullet$ suivie d'une méthylation (Fig II-6-1 (a)), soit il couple avec un radical méthylthiyl $-\bullet S\text{CH}_3$ préalablement formé et stabilisé par le centre $[4\text{Fe-4S}]$ du site soufre (Fig II-6-1 (b)).

Dans ce mécanisme, le point crucial est que le cluster du « site soufre » soit à l'état $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ puisque cet état rédox permet de générer formellement soit une espèce $-S^\bullet$ soit une espèce $-S^\bullet\text{CH}_3$. Or, la meilleure activité est obtenue en présence d'un large excès de dithionite avec des centres $[4\text{Fe-4S}]$ probablement réduits. Cependant, il est important de noter que, lors de la catalyse, deux espèces oxydantes sont produites : le centre $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ et Ado^\bullet . D'après la structure de l'holo-RimO les deux centres $[4\text{Fe-4S}]$ sont très proches facilitant les transferts d'électrons et il est concevable que ces transferts puissent favoriser la forme oxydée du cluster du « site soufre ».

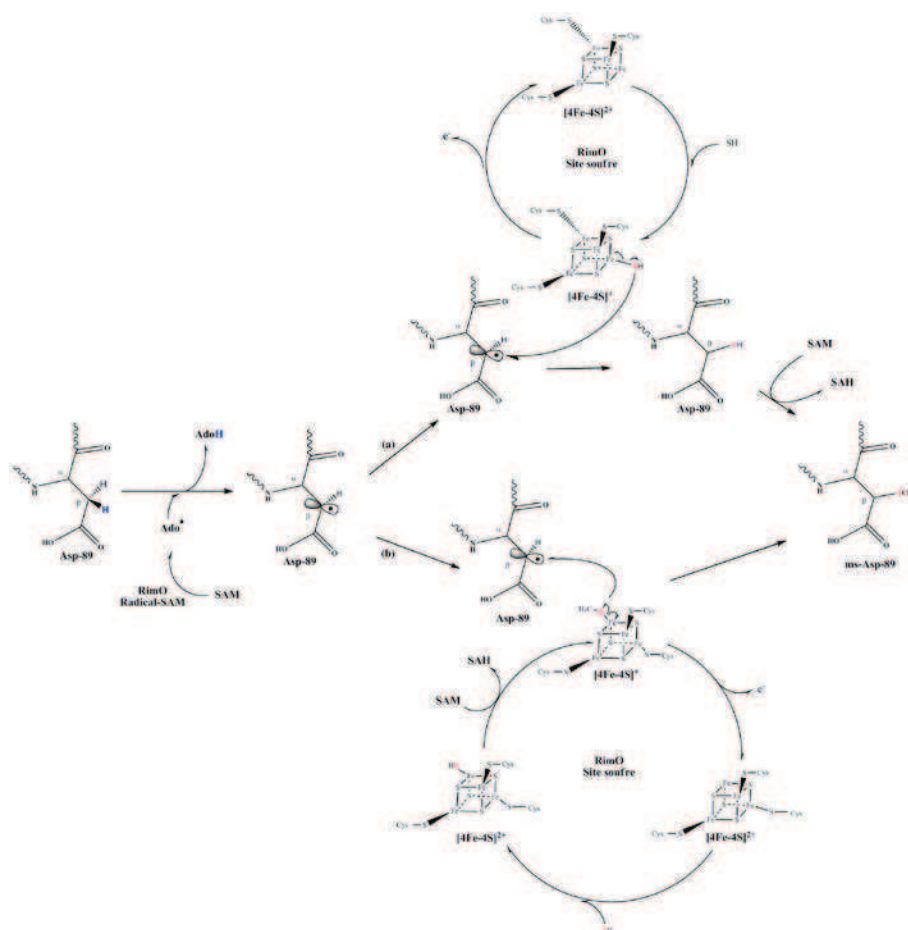


Figure II-6-1 : Mécanismes proposés pour le fonctionnement de RimO. Activation de la liaison C-H par la radical 5'-désoxyadénosyle suivie soit du transfert d'un soufre puis méthylation (a) soit du transfert direct d'un groupement thiométhyle sur l'intermédiaire radical-substrat (b).

II-6-2) Mécanismes proposés pour MiaB.

Dans le cas de l'enzyme MiaB, l'ensemble des expériences réalisées permet de proposer deux mécanismes réactionnels (Fig II-5-B).

Dans le premier mécanisme, le substrat est activé par Ado^\bullet pour générer une espèce radical-substrat. A nouveau, comme dans le cas de RimO, il existe deux possibilités. La première est que, suite à la formation de ce radical-substrat, le soufre est inséré par couplage radicalaire permettant la formation de l'intermédiaire $s^2i^6\text{A}37$. La méthylation de cet intermédiaire nécessite l'utilisation d'une deuxième molécule de SAM (Fig II-6-2-A (a)). La deuxième possibilité est que le radical-substrat réagisse directement par couplage radicalaire avec une espèce $-\text{SCH}_3$ permettant la formation du produit thiométhylé (Fig II-6-2-A (b)).

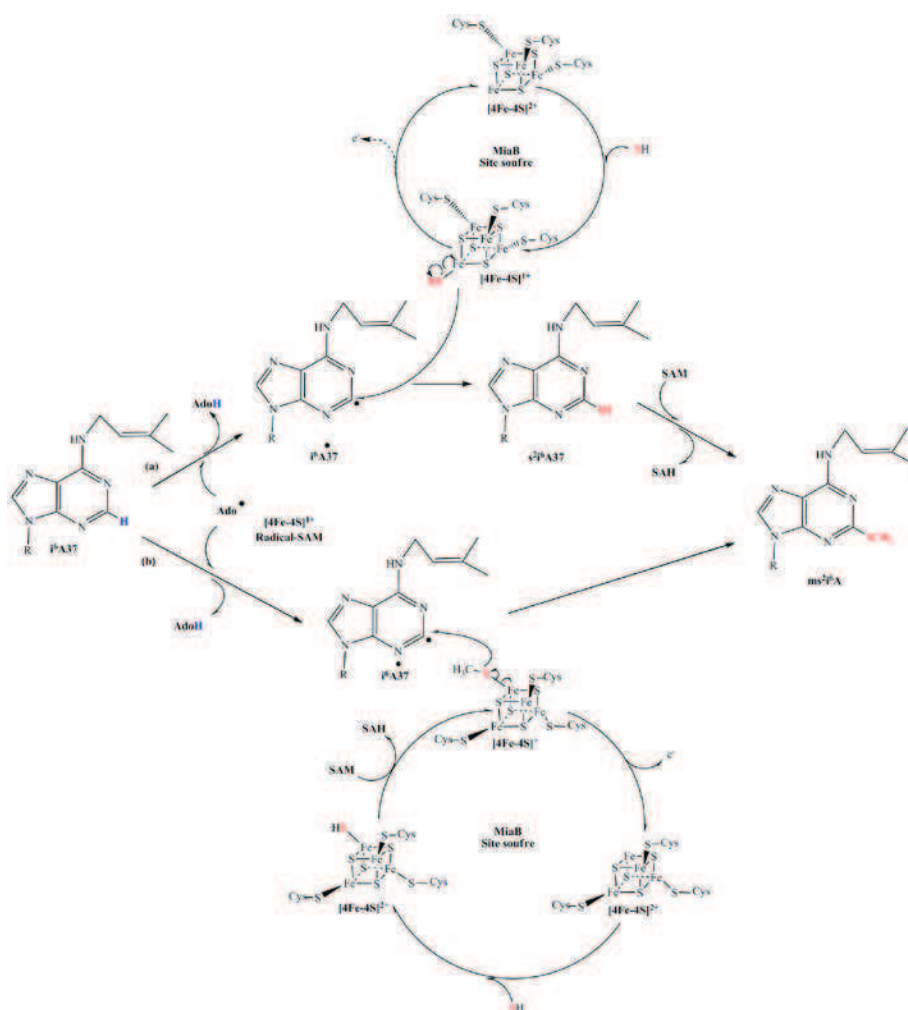


Figure II-6-2-A : Premier mécanisme proposé pour le fonctionnement de MiaB.

Cependant, deux articles récents (102, 103) sur les enzymes Radical-SAM RlmN et Cfr impliquées dans la méthylation de l'adénosine 2503 respectivement en position C2 et C8 de l'ARN ribosomal 23S, rapportent qu'en enzymologie, il n'y a pas de précédent pour l'arrachage d'un atome d'hydrogène de type sp^2 et que l'addition d'un intermédiaire radicalaire en C2 de l'adénosine est thermodynamiquement plus favorable (« There is no precedent in enzymology for abstracting a hydrogen atom from an sp^2 - hybridized carbon », Grove *et al.*, (102)). Or les résultats obtenus avec l'enzyme MiaB montrent que l'enzyme réalise plusieurs cycles en insérant un groupement $-SCH_3$ sur le carbone de type sp^2 en C2 de i^6A . Dans ce contexte, une alternative au mécanisme proposé précédemment peut être envisagée pour lequel l'espèce soufrée radicalaire s'additionne en position C2 sans activation de la liaison C-H. Contrairement aux enzymes Radical-SAM connues ceci signifierait que le premier évènement soit l'addition d'une espèce $-S^\bullet$ (Fig II-6-2-B (a)) ou $-S^\bullet CH_3$ (Fig II-6-2-B (b)) en C2 de i^6A , suivi de l'arrachement du proton en C2 par Ado^\bullet (Fig II-6-2-B).

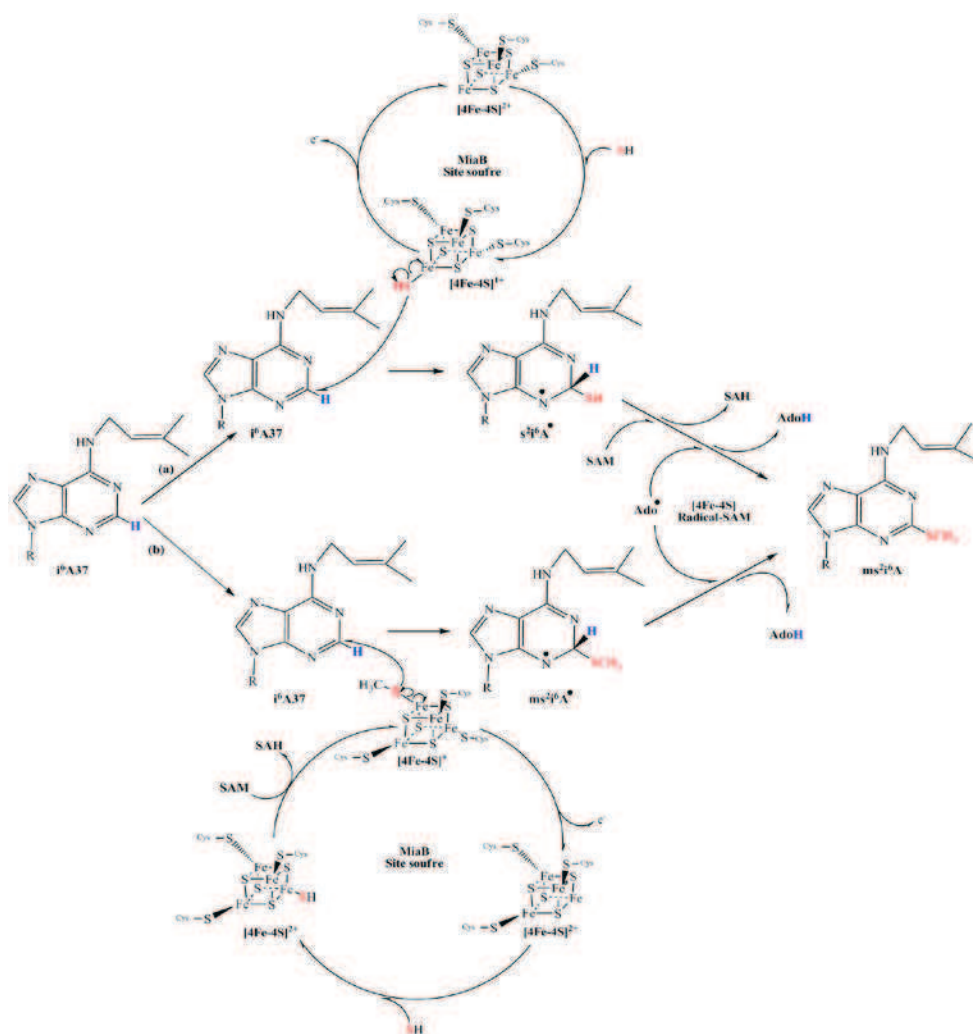


Figure II-6-2-B : Autre mécanisme possible pour le fonctionnement de MiaB.

Le fait que toutes les enzymes Radical-SAM caractérisées à ce jour fassent intervenir le radical Ado[•] pour activer le substrat est en faveur du premier mécanisme (Fig II-6-2-A). De plus, bien que l'énergie de liaison C-H du méthane ($BDE^* = + 439$ kJ/mol) et de AdoH ($BDE = + 433$ kJ/mol) soit bien plus faible que l'énergie de liaison C-H d'un benzène (+ 472 kJ/mol), la liaison C-H en position 2 d'une pyridine possède une énergie de liaison C-H de + 439 kJ/mol (104). Enfin, au sein d'une enzyme, l'environnement protéique peut certainement moduler les énergies des liaisons C-H rendant possible l'arrachage de l'hydrogène sp^2 en C2 de i^6A . De toute évidence, d'autres expériences sont nécessaires pour permettre de valider l'un de ces mécanismes réactionnels.

II-7) Perspectives.

Dans ces mécanismes réactionnels, plusieurs points restent obscurs et de nombreuses expériences sont envisagées. La première serait de marquer l'hydrogène oxydable du substrat avec un atome de deutérium. Cela devrait permettre de démontrer que le radical Ado[•] réagit directement sur le C2 de i^6A37 , en détectant par spectrométrie de masse AdoD au lieu d'AdoH. La deuxième, serait de produire une tige boucle ou un ARNt contenant s^2i^6A pour tester la méthylation du soufre par l'holo-MiaB et montrer que cette espèce est un intermédiaire réactionnel. La troisième serait d'établir par spectroscopie RPE et HYSCORE la présence de radicaux sur le centre $[4Fe-4S]$ du « site soufre » ($[4Fe-4S]^{1+}-S^{\bullet}$ ou $[4Fe-4S]^{1+}-S^{\bullet}CH_3$). La quatrième expérience serait de mesurer le nombre de molécules de SAM fixées par les holo-MTTases dans le but de mieux comprendre à quelle étape a lieu la méthylation de l'espèce soufrée. Enfin, il semble important d'optimiser les conditions de cristallisation de l'holo-RimO et de trouver des conditions de cristallisation de l'holo-MiaB afin obtenir des structures cristallographiques de ces MTTases en présence de leurs substrats et co-substrats. Dans le même ordre d'idées, il est envisageable de tester des conditions de cristallisation en présence des sous-produits de la réaction (AdoH, SAH, MTA et méthionine). Une étude de ce type permettrait de comparer les structures de l'holo-RimO et de l'holo-MiaB avec leurs substrats respectifs et de suivre les différentes étapes du cycle catalytique. Ce type d'étude cristallographique a déjà été mise en œuvre par notre équipe avec l'enzyme MiaA (105) qui catalyse la formation de i^6A sur l'ARNt^{Phe}.

* Bond Dissociation Enthalpies

III) Etude phylogénétique des MTTases.

Lors de la découverte du gène *rimO* par Anton *et al.*, une première étude bioinformatique a été publiée (73). Cette étude montre l'existence de différentes séquences de MTTases de fonctions inconnues présentes chez des organismes procaryotes et eucaryotes. Les auteurs présentent un arbre phylogénétique (Figure III) comportant trois classes nommées MiaB, RimO et YqeV dérivant d'une première branche. Une seconde branche comporte une classe de MTTase nommée MJ0867 définie par un gène provenant de l'organisme *M. jannaschii* (NP_247862) qui présente une forte homologie avec la séquence d'une MTTase humaine nommée Cdkal1(NP_060244).

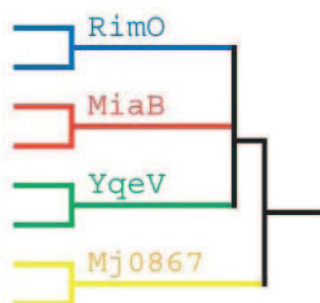


Figure III : Arbre phylogénétique des MTTases proposé par Anton *et al.*, (73).

En collaboration avec l'équipe du Dr J-F. Hunt (Columbia University, NY, USA) nous avons entrepris d'actualiser cette étude afin de mieux comprendre les liens entre composés thiométhylés et les enzymes responsables de leurs biosynthèses. Pour étayer la classification nous avons en parallèle effectué des tests d'activité enzymatique *in vivo* dans *E. coli* et *B. subtilis*.

III-1) Alignements de séquences de MTTases.

Un alignement de sept séquences de MTTases a été généré par le logiciel ClustalW, (RimO de *T. maritima* (TM1862), RimO d'*E. coli* (*ylig*), MiaB de *T. maritima* (TM0653), MiaB d'*E. coli* (*yleA*), MiaB de *B. subtilis* (*ymcB*, BSU17010), *yqeV* de *B. subtilis* (BSU25430) et CDKAL1 de *H. sapiens*) (Fig III-1). L'organisation en trois domaines est représentée par un code couleur : en vert, le domaine UPF0004, en bleu, le domaine Radical-SAM et en rouge le domaine TRAM. Les cystéines conservées du domaine Radical-SAM et du domaine UPF0004 sont respectivement marquées par des points rouges et noirs (Fig III-

1). Comme nous l'avons vu précédemment dans le chapitre II, une asparagine essentielle pour l'activité enzymatique est strictement conservée dans toutes ces séquences et est indiquée par un point bleu (Fig III-1).

Cet alignement montre les deux séquences de MTTases présentes chez *B. subtilis* correspondant aux gènes *yqeV* et *ymcB*. Dans cet organisme, la présence de ms^2i^6A et ms^2t^6A était connue (76). Le génome de *T. maritima* contient lui, trois séquences de MTTases dont deux codent respectivement pour les protéines MiaB (TM0653) et RimO (TM1862) qui ont été étudiées au laboratoire et une troisième apparentée à *yqeV* de fonction inconnue. Il faut noter que, dans *T. maritima*, la littérature fait état, à côté de ms^2i^6A , de la présence de deux autres thionucléosides ; le 2-thiométhyl- N^6 -thréonyl-carbamoyladénosine noté ms^2t^6A et le 2-thiométhyl- N^6 -hydroxynorvalyl-carbamoyladénosine noté ms^2hn^6A . Ces deux composés ne diffèrent que par l'ajout d'un groupement méthyle en position terminale sur le groupement thréonyl-carbamoyladénosine (Tableau III-3-2). La présence de 4 composés thiométhylés pour trois séquences protéique est un paradoxe qui sera discuté plus loin.

Par ailleurs, dans l'organisme *T. commune*, il a été rapporté l'existence du 2-thiométhyl- N^6 -methyladenosine (ms^2m^6A) (75). Enfin, la présence de ms^2i^6A et ms^2t^6A a été confirmée dans différents organismes eucaryotes dont *H. sapiens* (106, 107).

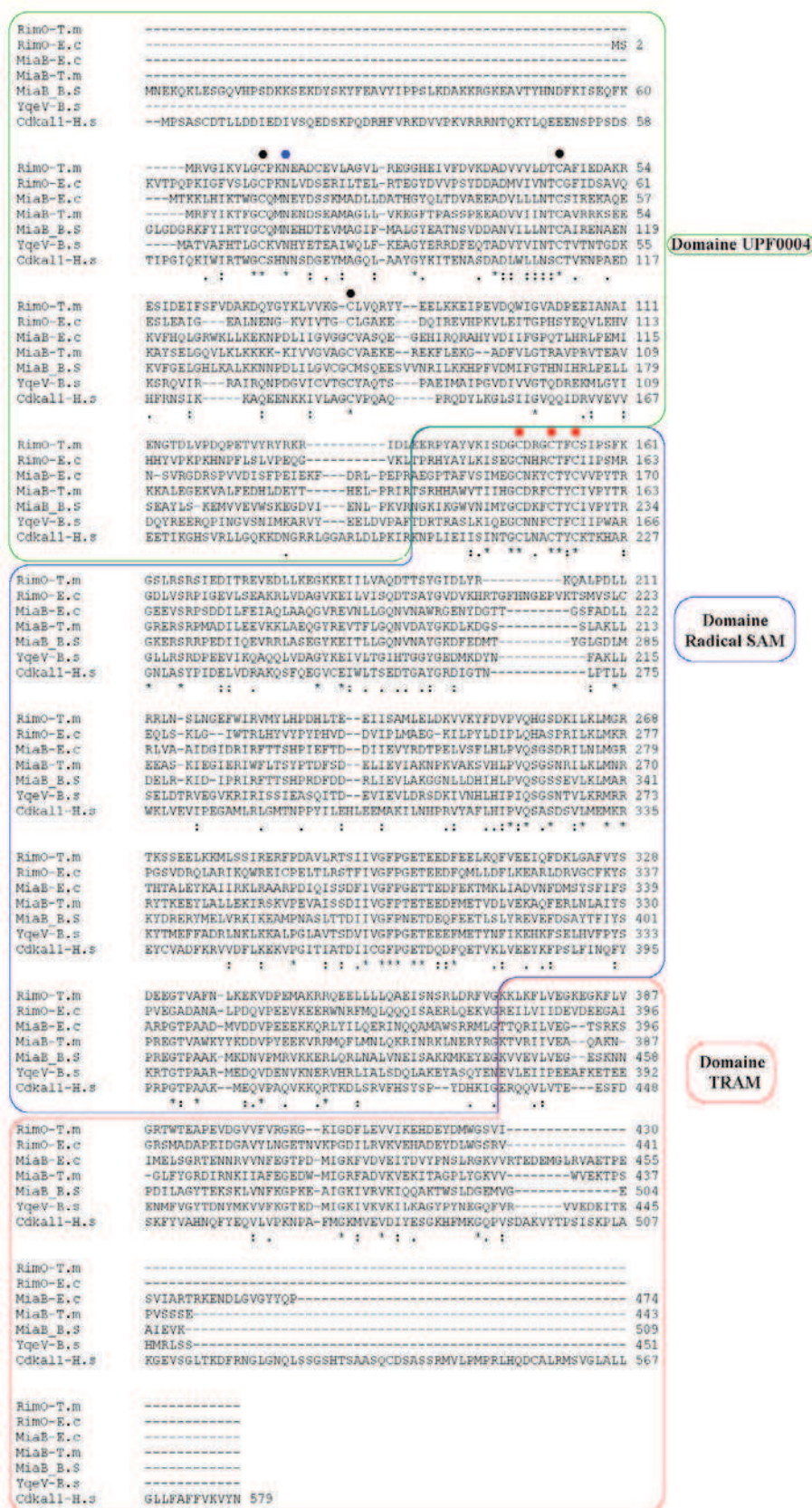


Figure III-1 : Alignement de sept séquences de MTTases. Les séquences de RimO de *T. maritima* (TM1862), RimO d'*E. coli* (*yliG*), MiaB de *T. maritima* (TM0653), MiaB d'*E. coli* (*yleA*), MiaB de *B. subtilis* (*ymcB*), *yqeV* de *B. subtilis* (BSU25430) et CDKAL1 de *H. sapiens* ont été alignées par le logiciel ClustalW.

III-2) Analyse bioinformatique des MTTases.

A partir d'un alignement des séquences de RimO et MiaB effectué avec le logiciel ClustalW, une recherche PSI-BLAST (Position-Specific Iterated BLAST) regroupant des protéines ayant vraisemblablement des fonctions similaires a été réalisée dans la base de données CRSH («*Classes of Reciprocal Sequence Homologues*») comportant 474 génomes bactériens classés par homologie de séquence et à laquelle a été ajouté le génome humain. Cette base de données, développée par Samuel Handelman est en accès libre sur le site orthology.org (<http://nmr.cabm.rutgers.edu:8080/ColumbiaStaging/>). Les séquences identifiées par cette recherche (score : $e < 0.05$) ont été combinées avec l'alignement initial pour réaliser un deuxième PSI-BLAST qui n'a permis la mise en évidence d'aucune autre séquence de MTTase. Le cladogramme résultant a été construit avec le programme MEGA 3.0. Ce cladogramme répertorie les séquences de MTTases en cinq classes. Les familles MiaB et RimO dont des représentants ont été étudiés *in vivo* et *in vitro*, sont situées aux deux extrémités de l'arbre phylogénétique présenté ci-dessous (Fig III-2). La famille RimO est représentée exclusivement par des séquences d'origine procaryote qui possèdent des points isoélectriques théoriques à caractère acide ($4,1 < pI < 6,8$). Pour la famille MiaB, l'arbre phylogénétique contient des séquences procaryotes dont MiaB d'*E. coli* et MiaB de *T. maritima* mais aussi des séquences eucaryotes comme MiaB d'*H. sapiens* (CDK5RAP1) (Fig III-2).

Sur ce cladogramme trois nouvelles familles de MTTases apparaissent dont deux sont nommées YqeV et Cdkal1. Ces deux familles se distinguent par leur phylogénie : la famille YqeV est présente chez les eubactéries et la famille Cdkal1 n'est trouvée que chez les archées et certains eucaryotes dont *H. sapiens*. Il faut aussi noter qu'aucune séquence de type Cdkal1 n'est trouvée chez les eubactéries. La troisième famille nommée MTL1 n'est présente que chez les ϵ -protéobactéries. Aucune enzyme appartenant à ce groupe n'a été caractérisée et de ce fait, cette famille a été appelée methylthiotransferase-like family 1 (MTL1). Il semblerait que les classes MiaB, RimO, YqeV et MTL1 soient absentes chez les archées. La colonne « nombre organisme » indique le nombre de génomes indépendants qui codent pour une séquence de MTTase au sein de chaque classe. Sur ce cladogramme, les nombres encerclés à l'embranchement de chaque famille indiquent le nombre de fois qu'un membre d'une autre famille est codé dans le même génome (sans correction de la redondance). Les nombres inscrits à la base de chaque clade représentent le pourcentage d'homologie pour chacun des

embranchements généré par le programme MEGA. Les taux de confiance pour la séparation entre les familles MiaB, YqeV, Cdkal1 et RimO sont respectivement de 100%, 78%, 98%, et 99%. La colonne « Nom organisme » indique pour chaque cadre de lecture le nom des protéines, le nombre d'acides aminés, le point isoélectrique théorique global suivi de celui du domaine TRAM de la protéine. Le domaine TRAM des séquences de MiaB est généralement basique alors que le domaine TRAM des séquences de RimO est généralement acide. Le domaine TRAM des autres familles de MTTases montre des variations de point isoélectrique plus importantes.

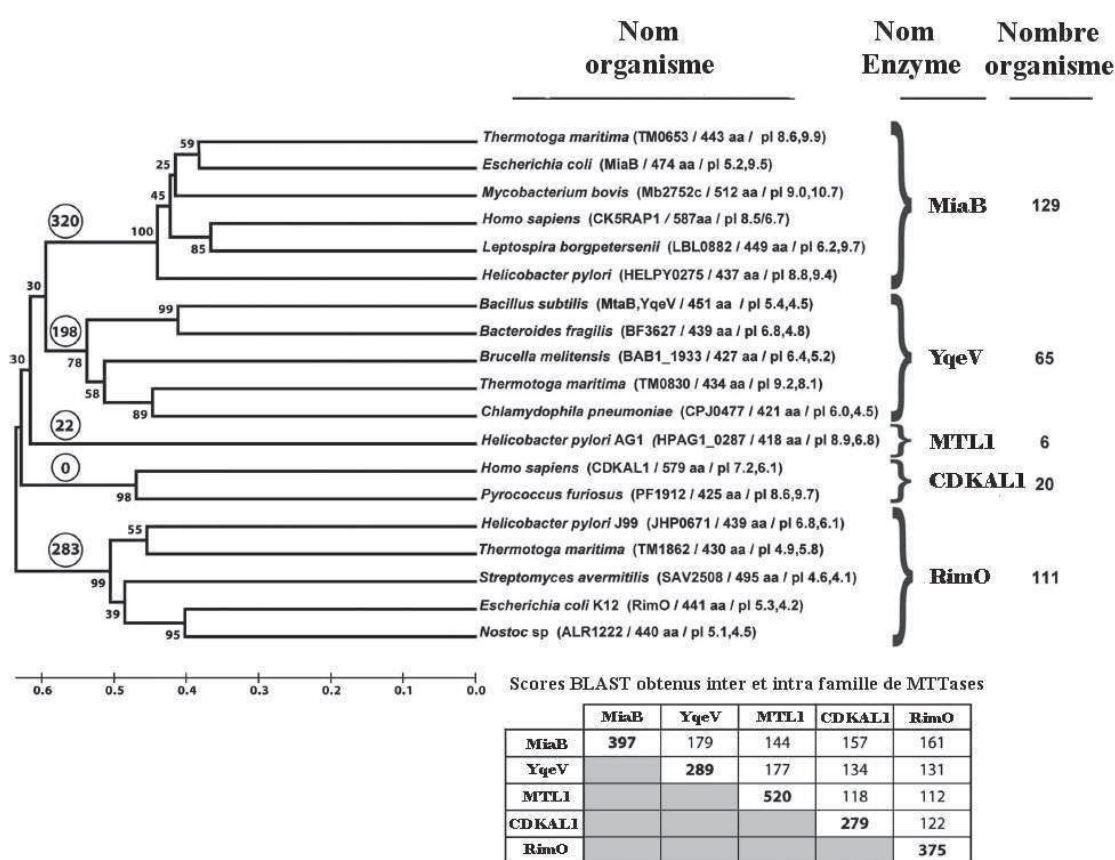


Figure III-2 : Analyse bioinformatique des cinq classes de MTTases MiaB, RimO, MTL1, YqeV et CDKALI. Ce cladogramme présente les familles de MTTases trouvées à partir d'une recherche systématique de séquences homologues MiaB/RimO dans le génome humain et dans 474 génomes procaryotes (JF Hunt). Alors que la famille MiaB contient des séquences paralogues procaryotes et eucaryotes, ce cladogramme ne révèle aucune séquence de famille RimO eucaryote. Cette étude décrit la phylogénie de deux familles de MTTases : la famille YqeV trouvée chez les eubactéries et la famille Cdkal1 présente à la fois chez les archées et chez certains eucaryotes. La dernière famille, nommée MTL1 (methylthiotransferase-like family 1), est présente chez les ϵ -protéobactéries.

Sur la base de cette étude bioinformatique nous avons fait l'hypothèse que les gènes *yqeV* et *cdkal-1* codent pour des MTTases impliquées dans la thiométhylation des ARNt et nous avons cherché à déterminer le substrat des deux enzymes.

III-3) Expression des MTTases YqeV de *B. subtilis* et Cdkal1 de *M. musculus* dans *E. coli* TX3346.

III-3-1) Le choix de la souche *E. coli* MiaB⁻ (TX3346).

Dans une première partie de notre étude nous avons choisi de travailler chez *E. coli* avec la souche TX3346 dont le gène *miaB* est inactivé ce qui se traduit par une absence de ms²i⁶A dans les ARNts. Les ARNt issus de cette souche possèdent donc les substrats potentiels pour les produits des gènes *yqeV* et *Cdkal-1* que sont i⁶A et t⁶A. Les gènes *yqeV* de *B. subtilis* et *cdkal1* de *M. musculus* ont été clonés respectivement dans le vecteur pT7-7 (M&M II-2) et pGEX6P-1 (M&M I-3-4). Après transformation de la souche *E. coli* TX3346 par les plasmides YqeV-Bs-pT7-7 et Cdkal1-Mm-pGEX6P1, les clones recombinants sont mis en culture et les ARNt sont purifiés suivant le protocole décrit dans la partie expérimentale et analysés par HPLC pour leur contenu en nucléosides modifiés.

III-3-2) Analyse HPLC et spectrométrie de Masse.

Les résultats de l'analyse HPLC sont présentés ci-dessous (Fig III-3-2). Les nucléosides modifiés ont été identifiés par leurs spectres UV-vis et par leur temps d'élution. L'analyse montre, en plus des pics attribués à t⁶A (41 min) et i⁶A (71 min), la présence d'un pic supplémentaire éluant à 52 min qui, d'après ce temps de rétention, serait ms²t⁶A. Le spectre UV-vis de ce pic est en accord avec cette attribution. (Fig III-3-2 (F)). De plus, il est à noter que l'intensité du pic correspondant à i⁶A est la même dans les ARNt obtenus à partir de la souche TX3346 seule ou transformée avec les plasmides contenant les gènes *yqeV* et *cdkal-1*. Cette expérience suggère fortement que les gènes *yqeV* de *B. subtilis* et *cdkal1* de *M. musculus* codent tous deux pour des MTTases responsables de la transformation de t⁶A en ms²t⁶A.

Afin de confirmer ces résultats, ces différents pics ont été analysés par spectrométrie de masse. Le produit élué à 41 min présente un spectre de masse (Fig. III-3-2G) avec deux

pic à 413,4 et 435,5 correspondant à la masse du produit t^6A chargé avec un proton ($412.34 + 1$) et un sodium ($412.34 + 23$) respectivement. Le produit élué à 52 min possède également un spectre de masse avec deux pics correspondant à $M = 458,2$ avec $[M+H] = 459,2$ et $[M + Na] = 481,3$ (Fig III-3-2 (H) et (I)). La masse moyenne prédite, référencée sur le site Modomics (<http://modomics.genesilico.pl/>), donne pour t^6A : $M = 412,35$ et pour ms^2t^6A : $M = 458,45$ comme le montre le tableau ci-dessous (Tableau III-3-2) en accord avec les analyses réalisées.

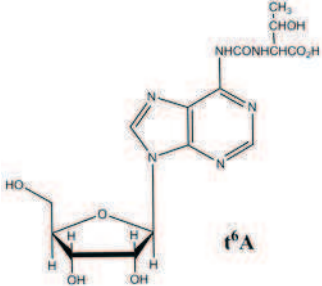
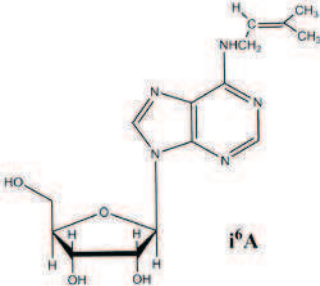
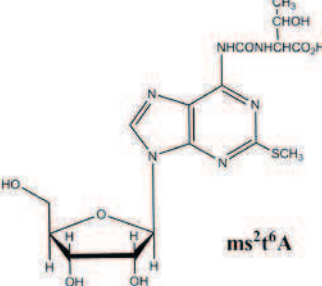
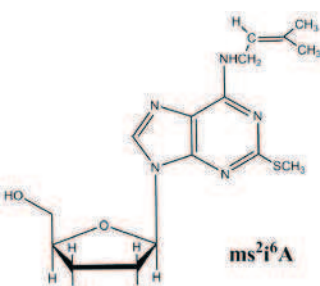
Structure	Masse moyenne (g.mol ⁻¹)	Structure	Masse moyenne (g.mol ⁻¹)
 t^6A	412,359	 i^6A	335,363
 ms^2t^6A	458,451	 ms^2i^6A	381,455

Tableau III-3-2 : Structures et masses moyennes des nucléosides modifiés t^6A , ms^2t^6A , i^6A , ms^2i^6A .

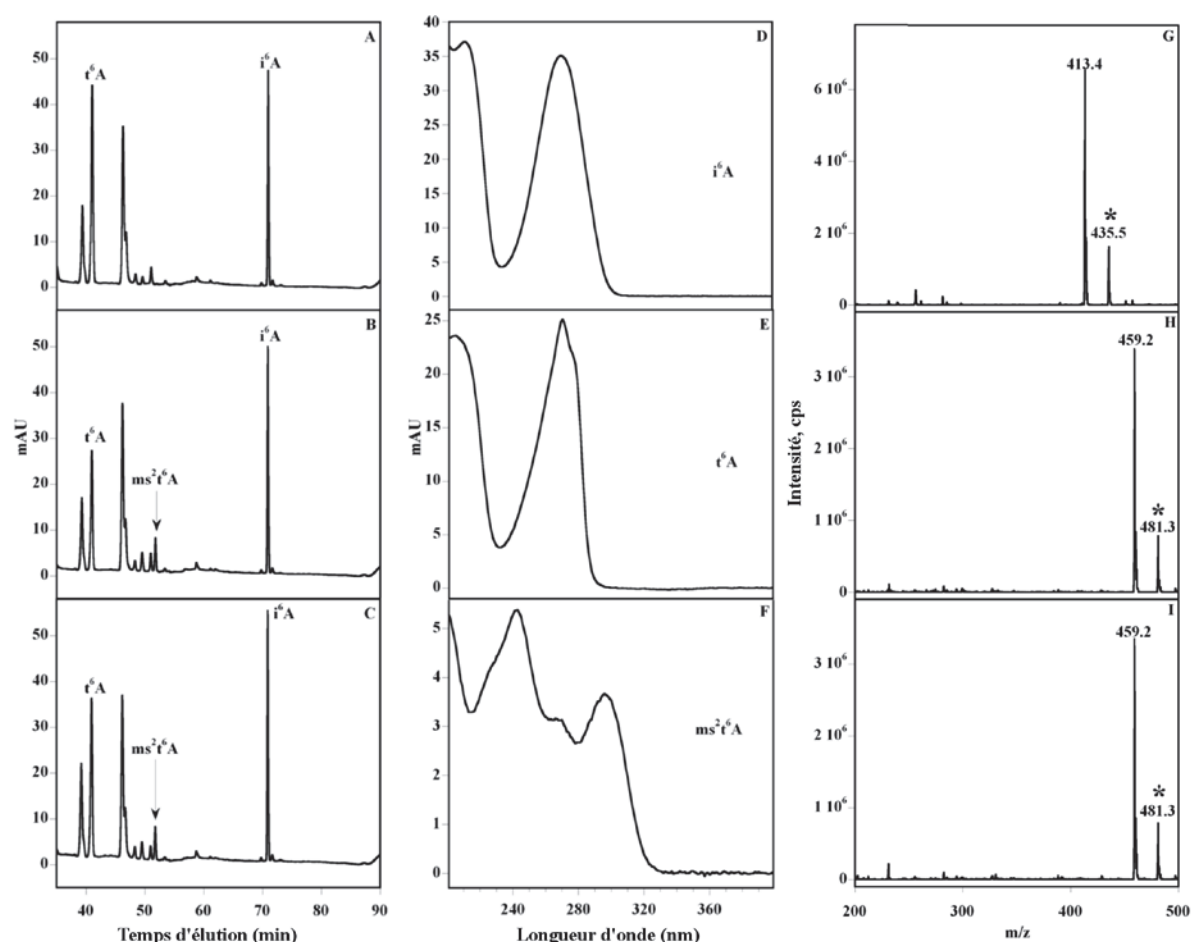


Figure III-3-2 : Analyse HPLC, spectres UV-visible et spectres de masse des nucléosides modifiés i^6A , t^6A et ms^2t^6A . L'analyse des nucléosides présents dans les ARNts des souches, *E. coli* TX3346 (A), *E. coli* TX3346 complémentée avec le plasmide YqeV-Bs-pT7-7(B) et *E. coli* TX3346 complémentée avec le plasmide Cdkal1-Mm-pGEX6P1(C) permet d'observer l'apparition d'un pic supplémentaire en B et C. Spectres UV-vis des nucléosides modifiés : i^6A (D), t^6A (E) et ms^2t^6A (F). Spectres de masse de : t^6A issu de la souche TX3346 (G), ms^2t^6A issu de la souche TX3346 complémentée avec YqeV-Bs-pT7-7 (H), ms^2t^6A issu de la souche TX3346 complémentée avec Cdkal1-Mm-pGEX6P1 (I). Les pics de masse possédant un astérisque correspondent aux ions pseudo moléculaires associés avec un atome de sodium.

III-4) Complémentation *in vivo* d'une souche de *B. subtilis* MGNA-C496 (*yqeV*⁻).

Au cours du processus de soumission de l'article pour publication il nous été demandé de réaliser la même étude mais cette fois-ci dans la souche bactérienne contenant le nucléoside modifié ms^2t^6A . En effet, la procédure classique qui permet d'attribuer une fonction à un gène donnée consiste à réaliser une expérience en deux étapes :

- 1- Inactivation du gène en question qui se traduit par la perte de la modification.
- 2- Complémentation de la souche ainsi obtenue avec le gène porté par un plasmide.

Après avoir obtenu la souche MGNA-C496 (*B. subtilis yqeV*) auprès de « National BioResource Project, NIG, Japan », nous avons construit le plasmide YqeV-Bs-pDG148 (M&M II-4-2) pour réaliser l'expérience de complémentation.

Trois expériences ont été menées en parallèle pour ce test de complémentation *in vivo*. La première a consisté à cultiver une souche sauvage de *B. subtilis* comme contrôle. La deuxième a été de cultiver le mutant *B. subtilis* MGNA-C496 (*yqeV*). Dans la troisième expérience la souche de *B. subtilis* MGNA-C496 a été complémentée avec le plasmide YqeV-Bs-pDG148 puis, lors de la culture, les cellules ont été collectées après 3 heures d'incubation en présence d'IPTG.

Après purification des ARNt des trois cultures, ceux-ci ont été digérés et les nucléosides modifiés analysés par HPLC comme décrit dans la partie expérimentale.

Le chromatogramme HPLC des nucléosides obtenus de la souche sauvage de *B. subtilis*, présente un pic ayant un temps d'élution de 52 min dont le spectre UV-vis est caractéristique de ms^2t^6A (Fig III-4 (A)). La même analyse réalisée avec les nucléosides des ARNts provenant du mutant *B. subtilis* MGNA-C496 (*B. subtilis yqeV*) montre l'absence du pic à 52 min (Fig III-4 (B)). Enfin, l'analyse des nucléosides modifiés provenant des ARNts issus du clone recombinant *B. subtilis* MGNA-C496 transformé avec le vecteur YqeV-Bs-pDG148 montre la présence de ms^2t^6A (Fig III-4 (C)). Les spectres UV-vis des modifications observées sont présentés avec de haut en bas : t^6A , ms^2t^6A , i^6A et ms^2i^6A (Fig III-4 (D) (E) (F) (G)). L'ensemble de ces résultats réalisés avec *B. subtilis* corrobore ceux obtenus avec *E. coli* et démontre sans ambiguïté que le produit du gène *yqeV* est la MTTase responsable de la transformation de t^6A en ms^2t^6A .

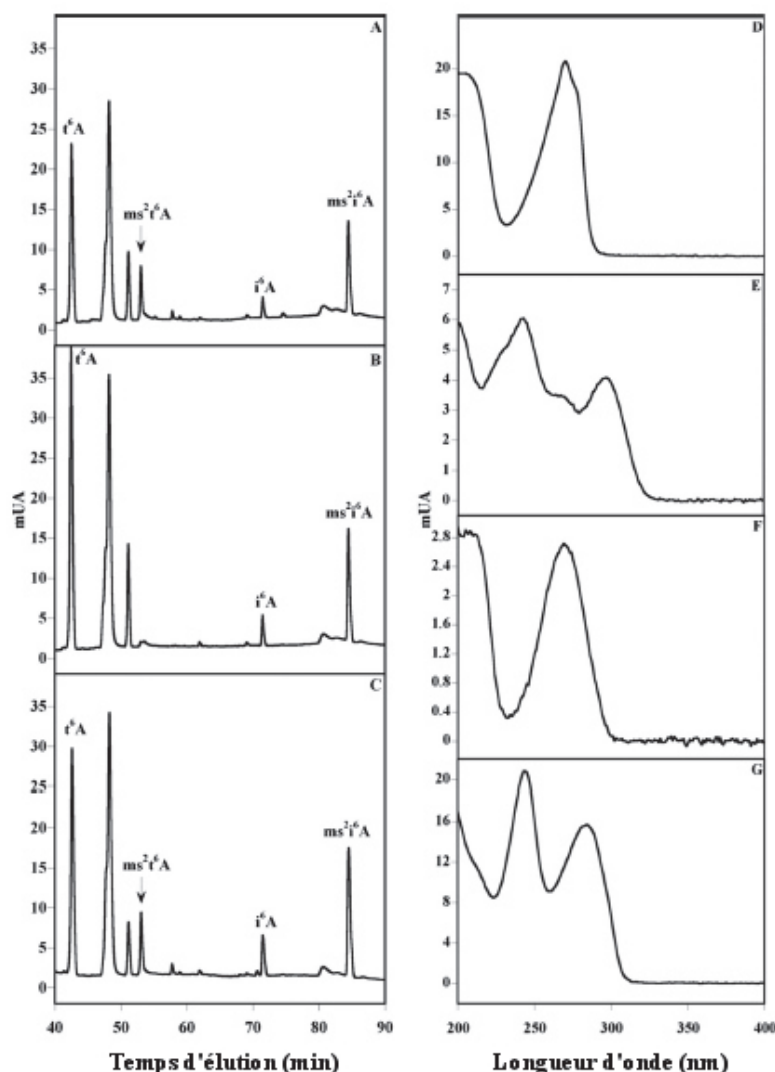


Figure III-4 : Analyse HPLC et spectres UV-vis des nucléosides modifiés t^6A , ms^2t^6A , i^6A et ms^2i^6A . Les nucléosides modifiés t^6A , ms^2t^6A , i^6A et ms^2i^6A sont présents dans une souche sauvage de *B. subtilis* (A) et possèdent des temps d'élution respectifs de 41 min, 52 min, 71 min et 85 min. Dans la souche MGNA-C496 (*B. subtilis yqeV*), la même analyse montre l'absence de ms^2t^6A (B). L'analyse des nucléosides modifiés issus du clone MGNA-C496 complétement avec le plasmide YqeV-Bs-pDG148 montre la réversion de ce phénotype qui se traduit par l'apparition du pic de ms^2t^6A (C). Spectres UV-vis des nucléosides modifiés : t^6A (D), ms^2t^6A (E), i^6A (F) et ms^2i^6A (G).

III-5) Une nouvelle nomenclature pour les familles de MTTases, YqeV et Cdkal1.

Sur la base des expériences de complémentation *in vivo*, les deux familles de MTTases YqeV et Cdkal1 ont été renommées respectivement MtaB et e-MtaB pour Methylthio Threonyl carbamoylAdenosine B. Un schéma réactionnel général a pu être proposé :

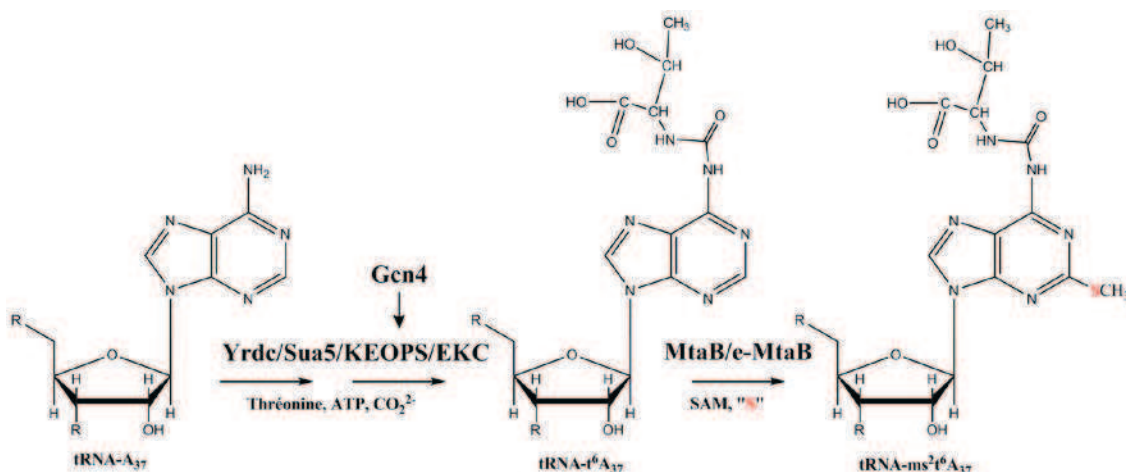


Schéma III-5 : Biosynthèse de $ms^2t^6A_{37}$ par hypermodification de l'adénosine 37. Les ARNt appariés au codon ANN possèdent une adénosine en position 37 modifiée par les enzymes Yrdc/Sua5 et transformée en t^6A . Suivant cette première modification, les deux familles MtaB et e-MtaB définies précédemment par analyse bioinformatique, catalysent la formation de ms^2t^6A .

Plusieurs enzymes semblent être impliquées dans la synthèse de t^6A notamment les enzymes Yrdc et Sua5. Récemment, d'autres enzymes ont été identifiées comme essentielles à la synthèse de t^6A notamment le complexe très conservé KEOPS/EKC (81) ainsi que Gcn4 qui régule ce complexe (82). Une fois le produit t^6A formé, les enzymes MtaB et e-MtaB catalysent la transformation de t^6A en ms^2t^6A par introduction d'un groupement méthylthio en position 2 de l'adénine 37.

Conformément à cette nouvelle nomenclature, les plasmides YqeV-Bs-pT7-7 et Cdkal1-Mm-pGEX6P1 seront maintenant nommés MtaB-Bs-pT7-7 et eMtaB-Mm-pGEX6P1.

III-5-1) Surexpression de MtaB de *B. subtilis* et Cdkal1 de souris dans la souche *E. Coli* BL21(DE3) RIL.

Les protéines MtaB de *B. subtilis* et e-MtaB de *M. musculus* ont été surproduites dans la souche *E. Coli* BL21(DE3) RIL. L'analyse des cellules par gel SDS-PAGE est présentée ci-dessous (Fig III-5-1). La souche contrôle *E. Coli* BL21(DE3) RIL[®] est montrée en (1) et (4). Ces deux puits permettent de voir les protéines d'*E. coli* dont la chloramphénicol acétyltransférase qui possède une masse moléculaire de 25 663 Da. La souche *E. Coli* BL21(DE3) RIL[®] transformée par le plasmide MtaB-pT7-7 est montrée avant induction avec de l'IPTG en (2) et après induction en (3) (Fig III-5-1). La présence de la protéine MtaB est bien visible en (2) et ce, malgré l'absence d'induction due au fait que le promoteur T7 est un

promoteur fort. L'ajout d'IPTG entraîne néanmoins une surproduction de la protéine MtaB importante en (3) dont la masse observée est en accord avec la masse prédite (51 258 Da). De la même manière, l'analyse des cellules *E. Coli* BL21(DE3) RIL[®] transformées par le plasmide eMtaB-Mm-pGEX6P1 est présentée, avant induction à l'IPTG en (5), et après induction en (6) (Fig III-5-1). Ce plasmide permet d'exprimer la protéine eMtaB (65 289 Da) fusionnée avec la glutathion-S-transférase (GST, 25 000 Da) en accord avec la masse moléculaire de la protéine chimérique e-MtaB-Mm-GST (Fig III-5-1).

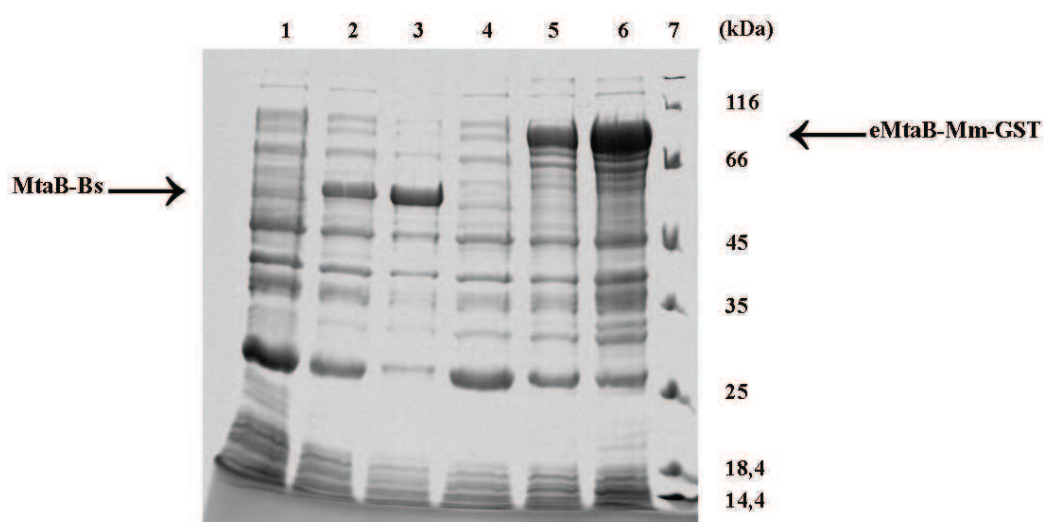


Figure III-5-1 : SDS-PAGE 12 % des cellules *E. coli* BL21(DE3) RIL[®] surexprimant MtaB de *B. subtilis* et e-MtaB de *M. musculus*. BL21(DE3) RIL[®] (1), BL21(DE3) RIL[®] transformées avec MtaB-pT7-7 (2), BL21(DE3) RIL[®] transformées avec MtaB-pT7-7 en présence d'IPTG (3), BL21(DE3) RIL[®] (4), BL21(DE3) RIL[®] transformées avec eMtaB-Mm-pGEX6P1 (5), BL21(DE3) RIL[®] transformées avec eMtaB-Mm-pGEX6P1 en présence d'IPTG (6).

III-5-2) Purification de MtaB de *B. subtilis*.

Les cellules *E. coli* BL21(DE3) RIL[®] contenant la protéine MtaB de *B. subtilis* ont été collectées puis congelées. Après sonication et ultracentrifugation, la protéine est purifiée par FPLC sur colonne butyl-sépharose. La dialyse des fractions contenant la protéine MtaB permet d'éliminer le sulfate d'ammonium présent dans la solution. La protéine ainsi obtenue est finalement purifiée sur colonne bleu-sépharose (M&M III-3-5). La pureté de la protéine est estimée à 95% d'après le gel SDS-PAGE 12% (Fig III-5-2). MtaB de *B. subtilis* possède une masse moléculaire théorique de 51 258 Da en accord la masse moléculaire estimée sur le gel (Fig III-5-2).

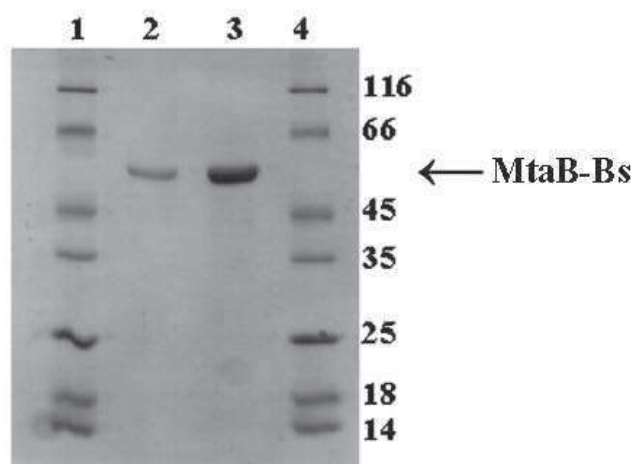


Figure III-5-2 : SDS-PAGE 12% de la protéine MtaB de *B. subtilis* après purification. Marqueurs de poids moléculaire (1) et (4), 2 µg de protéine MtaB de *B. subtilis* (2), 6 µg de protéine MtaB de *B. subtilis* (3).

III-5-3) Caractérisation spectroscopique par UV-visible et RPE de l'holo-MtaB.

Les centres [Fe-S] sont reconstitués en boîte à gants dans l'apo-MtaB purifiée comme décrit précédemment pour les holoprotéines RimO et MiaB (M&M III-5-1) mais en raison de l'antériorité de l'étude, la reconstitution des centres FeS a été conduite selon le protocole initial (sans chauffage). Après purification de l'holo-MtaB par filtration sur gel (NAP-25), la protéine est concentrée puis caractérisée par spectroscopie UV-visible. Les spectres UV-vis des formes apo et holo sont présentés ci-dessous (Fig III-5-3-A). L'holoprotéine présente une bande de transfert de charge à 400 nm caractéristique de la présence d'un centre [Fe-S]. Le coefficient d'extinction molaire à 280 nm de l'holo-MtaB ($30 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) a été calculé sur la base de la concentration de la protéine établie avec précision par dosage des acides aminés. Cette valeur est en accord avec la présence de deux centres [Fe-S]. Le dosage du fer et du soufre donne respectivement $7,5 \text{ Fe} \pm 0,2$ et $7,5 \pm 0,5 \text{ S}$ par monomère de MtaB et est également compatible avec la présence de deux centres $[4\text{Fe}4\text{S}]^{2+/+}$ par monomère de MtaB.

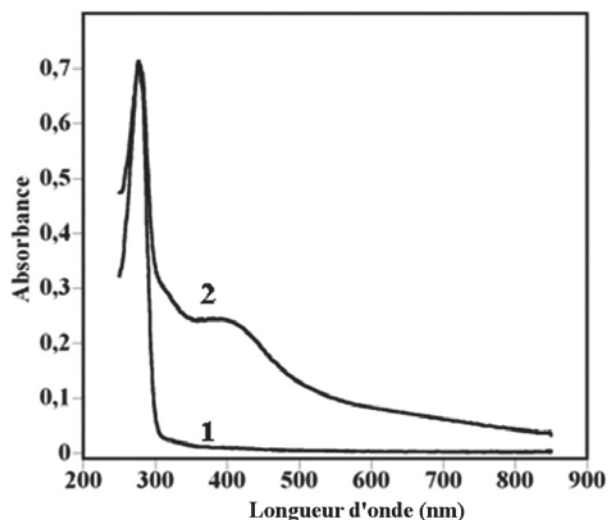


Figure III-5-3-A : Spectre UV-Vis de l'apoprotéine (1) et de l'holoprotéine (2) MtaB de *B. subtilis*.

Une caractérisation spectroscopique complète de l'holo-MtaB par spectroscopie RPE, Mössbauer et HYSCORE a été envisagée mais n'a pas été entreprise pour des raisons de redondance, dans le cadre de ce travail, avec les deux autres systèmes déjà étudiés au laboratoire (MiaB & RimO).

Cependant, pour valider la présence effective de centres $[4Fe4S]^{2+/+}$ dans la protéine, l'holo-MtaB de *B. subtilis* a été réduite avec un excès de dithionite puis analysée par spectroscopie RPE. Le comportement en puissance et en température du signal $S = 1/2$ observé est caractéristique d'un centre $[4Fe4S]^{2+/+}$ (Fig III-5-3-B).

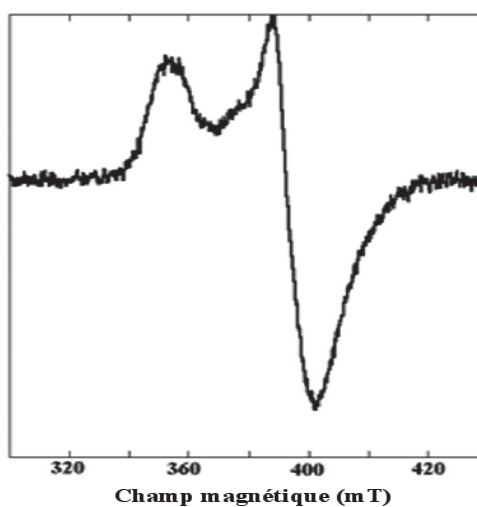


Figure III-5-3-B : Spectre RPE en bande X de l'holo-MtaB de *B. subtilis*. La protéine holo-MtaB (100 μ M) est réduite par le dithionite (1 mM) dans du tampon Tris-Cl 50 mM, KCl 50mM, pH 8,0. Conditions d'enregistrement : P = 100 μ W; f = 9.6 GHz; Mod = 1 mT; T = 12K.

III-5-4) Test enzymatique *in vitro* de MtaB et e-MtaB.

Pour mettre en évidence l'activité enzymatique *in vitro* de la protéine MtaB de *B. subtilis*, l'enzyme a été incubée 1h à 37°C en milieu réducteur en présence de SAM et d'ARNts extraits de la souche *B. subtilis* MGNA-C496 (*mtaB*(-)). Après digestion des ARNts présents et analyse HPLC des nucléosides modifiés, il n'a pas été possible d'identifier le pic correspondant à ms²t⁶A. Nous avons vu (Chapitre 2) que les activités MTTases de MiaB et RimO dont les gènes proviennent d'organismes thermophiles sont beaucoup plus élevées que celles de leur paralogues mésophiles. Pour cette raison, les deux gènes *Tm0830* issu de *T. maritima* et *Pab1134* issu de *P. abyssi* ont été clonés dans le vecteur pT7-7. Avec ces protéines thermophiles, nous pensions avoir de meilleures chances d'observer une activité *in vitro* mais nous voulions aussi confirmer l'activité MTTase de ces deux protéines (M&M II-2) classées lors de l'analyse bioinformatique comme MtaB et eMtaB. Des tests de surexpression de ces deux protéines (M&M Tableau II-2) montrent que ces deux MTTases MtaB de *B. subtilis* (MtaB-Tm, 49 324 Da) et e-MtaB de *P. abyssi* (eMtaB-Pa, 48 537 Da) sont abondamment produites en (3) et en (5) par rapport aux expériences contrôles avec la souche *E. coli* BL21(DE3) RIL[®] en (1) et en (4) (Fig III-5-4).

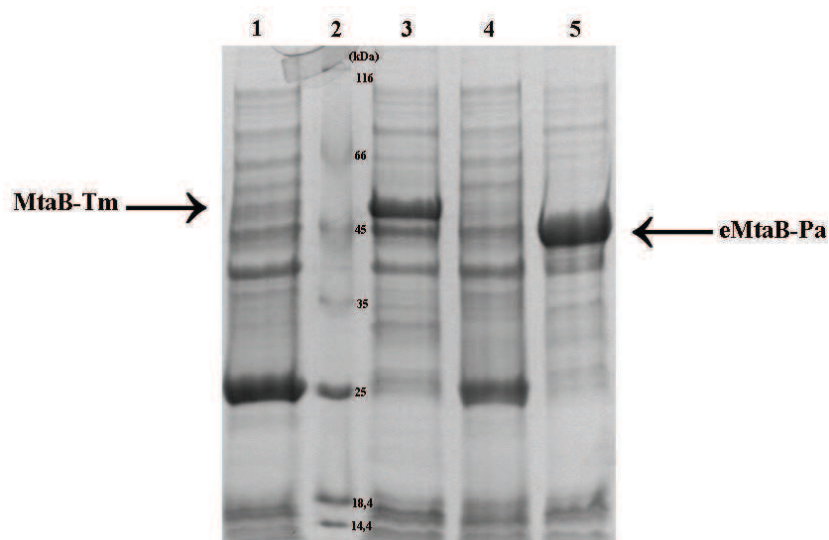


Figure III-5-4 : Profil de surexpression des MTTases MtaB de *T. maritima* (TM0830) et eMtaB de *P. abyssi* (PAB1134) sur gel SDS-PAGE 12%. Contrôle de la souche *E. coli* BL21(DE3) RIL[®] (1) et (4) où seule la chloramphénicol acétyltransférase est produite abondamment. Induction par IPTG de la protéine MtaB de *T. maritima* (49 324 Da) (3). Induction par IPTG de la protéine Cdkal1 de *P. abyssi* (48 537 Da) (5).

Différents essais de purification ont été réalisés en utilisant le mode de préparation utilisé précédemment pour les MTTases RimO et MiaB de *T. maritima*. Ce travail est en cours et les tests d'activité *in vitro* de ces deux protéines n'ont pas encore été réalisés. La mise en place d'un test d'activité pour la famille e-MtaB (Cdkal1), en utilisant la protéine e-MtaB de *P. abyssi* permettrait pour la première fois de tester l'activité *in vitro* d'une MTTase de cette classe ayant des représentants chez certains eucaryotes dont l'Homme.

III-6) Discussion

Au cours de ce chapitre, une étude bioinformatique des MTTases a permis de classer les séquences connues en cinq familles MiaB, RimO, MTL1, MtaB et e-MtaB. Chez *E. coli*, la seule MTTase modifiant des ARNts est l'enzyme MiaB et l'unique nucléoside contenant un groupement thiométhyle est ms²i⁶A. L'analyse bioinformatique montre que la majorité des séquences de protéines RimO possède un domaine TRAM acide. Ce résultat est important puisqu'il permet d'appuyer l'hypothèse de reconnaissance de la protéine ribosomale S12 basique par le domaine TRAM de RimO acide et d'étendre cette notion de reconnaissance « enzyme/substrat » à toutes les séquences paralogues de RimO de *T. maritima*. D'autre part, la plupart des séquences de protéines MiaB possèdent un domaine TRAM basique permettant la reconnaissance d'un substrat acide comme les ARNt. Le mode de reconnaissance utilisé par les MTTases pour reconnaître leurs substrats est un sujet particulièrement d'actualité. En effet, un article récent (108) suggère que la protéine YcaO intervient directement comme partenaire de RimO dans reconnaissance de la protéine S12. Les auteurs de cette étude proposent une interaction entre la protéine S12 et la protéine YcaO et annoncent qu'un mutant *E. coli ycaO* possède un taux de thiométhylation de la protéine S12, 23 fois inférieur à celui d'une souche *E. coli* sauvage (108). Cependant, dans cette étude, les auteurs ne discutent pas du mode de reconnaissance proposé par notre équipe sur la base de la structure de l'apo-RimO. Deux points au moins semblent aller à l'encontre de cette proposition. Le premier est que la protéine YcaO ne semble pas être conservée au cours de l'évolution, notamment *T. maritima* ne possède pas de protéine paralogue alors qu'il contient RimO. Le deuxième est que les tests d'activité enzymatique de l'holo-RimO développés par notre équipe avec la protéine RimO de *T. maritima* et par l'équipe de SJ Booker avec la protéine RimO d'*E. coli*, montrent que ces enzymes catalysent *in vitro* l'insertion d'un groupement thiométhyle en absence de la protéine YcaO.

L'analyse des nucléosides présents dans les ARNts de la souche *E. coli* TX3346 (*E. coli miaB*⁻) montre l'absence de nucléosides thiométhylés et la présence des nucléosides t⁶A et i⁶A. La souche *E. coli* TX3346 a été transformée soit avec le plasmide MtaB-Bs-pT77, soit avec le plasmide Cdkal1-Mm-pGEX6P1 et après induction à l'IPTG les protéines YqeV et Cdkal1 ont été surproduites. L'analyse des nucléosides présents dans les ARNts montre que ces deux enzymes catalysent la formation de ms²t⁶A à partir de t⁶A. Afin de confirmer ces informations, des expériences dans l'organisme *B. subtilis* ont été entreprises sur la souche sauvage (produisant ms²t⁶A) et sur la souche MGNA-C496 ne possédant plus le gène *yqeV* (*B. subtilis yqeV*⁻). Enfin, après avoir cloné le gène *yqeV* dans le plasmide pDG148, une expérience de complémentation a été menée et a démontré la réversion du phénotype (présence de ms²t⁶A). L'ensemble des données obtenues permet de dire que les enzymes YqeV et Cdkal1 sont des MTTases qui catalysent l'insertion d'un groupe thiométhyle en position 2 de la N-6-thréonylcarbamoyl adénosine 37 de certains ARNts. Pour cette raison, la famille de MTTase YqeV, présente chez les eubactéries, a été renommée MtaB alors que la famille Cdkal1, présente chez les archées et les eucaryotes, a été renommée e-MtaB. Dans une étude similaire sur la protéine YqeV de *B. subtilis*, Anton *et al.*, (109) proposent de renommer ce gène, *tmtb*.

Suite à ces résultats *in vivo*, la protéine MtaB de *B. subtilis* (MtaB-Bs) a été purifiée et les centres [4Fe-4S] reconstitués en boîte à gants. Le dosage de la quantité de fer et de soufre réalisé sur l'holo-MtaB de *B. subtilis* montre une stœchiométrie de 7,5 Fe ± 0,2 et 7,5 ± 0,5 S par monomère de MtaB-Bs. Par ailleurs, l'holo-MtaB de *B. subtilis* réduite par ajout d'un excès de dithionite et analysée par RPE en bande X montre un signal typique de centre [4Fe-4S]⁺. Cette analyse, bien que succincte comparée à celles des enzymes MiaB de *T. maritima* et de RimO de *T. maritima* permet cependant de valider la présence de deux centres [4Fe-4S]^{2+/+} dans cette famille.

Après la caractérisation de l'enzyme, un test d'activité de l'holo-MtaB de *B. subtilis* a été réalisé mais aucune activité n'a pu être détectée. Différentes explications à ce résultat négatif peuvent être invoquées. Tout d'abord, dans les différentes enzymes Radical-SAM connues impliquées dans l'insertion de soufre par voie radicalaire connues, il n'est pas rare que les activités soient très faibles, avec un nombre de cycles catalytiques inférieur à 0,5 par monomère de protéine. Par exemple, l'activité de RimO d'*E. coli* rapportée est de 0,12 cycles catalytiques (88). Afin de mettre en place un test d'activité, deux gènes d'organismes

thermophiles ont été clonés l'un de la famille MtaB (TM0830) et l'autre de la famille e-MtaB (PAB1134). Le taux de surexpression important de ces protéines laisse espérer qu'un test d'activité puisse être développé rapidement.

D'un point de vue mécanistique, les familles MtaB et e-MtaB sont très proches de la famille MiaB. En effet, bien que les substrats soient différents, la position 2 de l'adénosine, où a lieu l'insertion du groupement thiométhyle, est la même dans toutes les MTTases agissant sur les ARNts. Intuitivement, la similitude des substrats des trois familles MiaB, MtaB, e-MtaB suggère que ces enzymes sont plus proches les unes des autres que de la famille RimO. L'étude bioinformatique réalisée confirme cette hypothèse. Par ailleurs, Anton *et al.*, (109) ont montré qu'une protéine chimérique contenant le domaine N-terminal et le domaine Radical-SAM de MiaB de *B. subtilis* peut remplacer au domaine TRAM de MtaB de *B. subtilis* permet de restaurer la présence de ms²i⁶A dans une souche *B. subtilis miaB*⁻ (souche BSF2806). Cette expérience suggère que les domaines TRAM de MtaB de *B. subtilis* et de MiaB de *B. subtilis* sont très proches structurellement et fonctionnellement puisque le domaine de MtaB de *B. subtilis* peut remplacer le domaine TRAM de MiaB de *B. subtilis*. Si le domaine TRAM n'intervient pas dans la différenciation des substituants en position N6 de l'adénosine 37 (i⁶A ou t⁶A), ce domaine pourrait être vu comme une pince qui se referme sur l'ARNt substrat. D'après les auteurs de cette étude, la discrimination entre les ARNt contenant i⁶A et ceux contenant t⁶A reposerait sur 13 acides aminés répartis sur les trois domaines.

Par ailleurs l'analyse bioinformatique a permis de classer les méthylthiotransférases présentes dans les organismes eucaryotes. Chez l'Homme, la présence des deux nucléosides modifiés ms²i⁶A et ms²t⁶A est connue. En accord avec l'analyse bioinformatique, la famille de MTTase eucaryote référencée sous le nom de Cdk5rap1 est affiliée à la famille MiaB et catalyse vraisemblablement la formation de ms²i⁶A. Les expériences réalisées sur la protéine e-MtaB de *M. musculus* ont permis de détecter pour la première fois une activité MTTase *in vivo* avec une MTTase d'origine eucaryote. Cette activité *in vivo* montre que la famille Cdkal1 renommée e-MtaB catalyse la formation de ms²t⁶A.

Des résultats récents montrent que la famille e-MtaB est impliquée, chez l'Homme, dans le diabète de type 2. Cette maladie est liée à une désensibilisation des cellules cibles du foie vis-à-vis de l'insuline. Pour cette raison le diabète de type 2 est aussi appelée diabète

insulino-résistant. Cette résistance à l'insuline a pour conséquence une hyperglycémie chronique qui entraîne une destruction des cellules β des îlots de Langerhans productrices de l'insuline humaine. La destruction de ces cellules conduit à une diminution de la production d'insuline ce qui a pour conséquence l'aggravation du diabète de type 2. Du fait de l'importance de la glycémie chez l'homme, la régulation de la production d'insuline est particulièrement contrôlée. Récemment, plusieurs études ont montré une corrélation positive entre l'existence de cette pathologie et la présence d'un insert dans le 5^{ème} intron (90 kb) du gène *Cdkal1* situé sur le chromosome 6 (locus : 6p22.3). Ces insertions seraient de tailles variables selon les populations (rs7754840 = 90 kb (110), rs7754840 = rs10946398 WTCCC/UKT2D ($r^2 = 1$) (111) rs7756992 = 201,7kb (112), rs10946398 (113, 114), rs4712523, rs7754840, rs7756992 (115). En toute hypothèse, la présence d'un insert dans l'intron 5 du gène *Cdkal1* semble être un facteur de risque pour le diabète de type 2. Cette insertion de plusieurs milliers de nucléotides perturbe très probablement l'épissage du gène *cdkal1*. Comme le suggère une étude récente, publiée dans le journal PloS One (116), l'absence de ms^2t^6A sur certains ARNts pourrait entraîner un dysfonctionnement de la traduction au niveau du réticulum endoplasmique augmentant le risque du diabète de type 2.

Des résultats récents, fruit d'une collaboration entre notre équipe et le laboratoire du Dr. Fan-Yan montrent un lien direct entre l'absence de ms^2t^6A et le diabète de type 2 (Fan Yan *et al*, accepté 2011). Contrairement aux études précédentes basées sur des statistiques appliquées à différentes populations, cette étude a été menée *in vivo* sur des organismes modèles (modèles murin : wt, KO *cdkal1* et *B. subtilis*). Bien que la morphologie des cellules β des îlots de Langerhans soit normale dans le mutant murin KO *cdkal1*, ces souris sont sensibles au glucose ce qui entraîne une diminution de la quantité d'insuline présente dans le pancréas et dans le sérum ainsi qu'une diminution de la synthèse de proinsuline. De plus, des résultats montrent que l'absence de ms^2t^6A entraîne une diminution de l'efficacité de la traduction qui pourrait conduire à une diminution drastique de la quantité d'insuline sécrétée. L'hypothèse la plus extrême pour expliquer cette moindre efficacité est que l'absence de ms^2t^6A provoque un décalage du cadre de lecture lors de la traduction entraînant une interruption de la synthèse protéique en cours. Si cette hypothèse était confirmée, les cellules β des îlots de Langerhans spécialisées dans la synthèse de l'insuline ne seraient plus capables de produire suffisamment d'insuline. Cependant, il ne faut pas oublier que le diabète de type 2 reste une maladie multifactorielle impliquant au moins une dizaine de gènes avec

probablement des actions pléiotropes et les mécanismes moléculaires de cette maladie sont pour l'instant très mal compris.

L'approche utilisée pour étudier les MTTases, qui combine la bioinformatique et des expériences *in vivo*, a permis de mettre en évidence la fonction des familles MtaB (YqeV) et e-MtaB (Cdkal1). Le fait que e-MtaB (Cdkal1) de souris soit fonctionnelle dans l'organisme procaryote *E. coli* montre que le mode de reconnaissance entre l'enzyme et son substrat a été conservé au cours de l'évolution. Ceci implique que ces enzymes, présentes dans les trois domaines du vivant (Bactéries, Archées et Eucaryotes), sont apparues très tôt au cours de l'évolution. Un scénario possible est que le premier gène de MTTase ait servi à modifier les ARNts. Au cours de l'évolution, diverses versions de ce gène auraient été dupliquées pour donner les classes, MiaB, MtaB et e-MtaB actuelles et ensuite, chez les eubactéries, la classe RimO.

III-7) Perspectives.

III-7-1) Hypothèses sur la formation de hn^6A et ms^2hn^6A .

Certains résultats de la littérature concernant *T. maritima* font mention, à côté de ms^2i^6A et ms^2t^6A , de la présence d'un troisième thionucléoside : ms^2hn^6A (Tableau III-7-1). Cependant, une analyse du génome de cet organisme montre qu'il contient seulement trois séquences de MTTases: MiaB (TM0653), RimO (TM1862) et MtaB (TM0830). Un examen attentif de la structure des nucléosides hypermodifiés de l'adénosine 37, montre que ms^2hn^6A ne diffère de ms^2t^6A que par l'ajout d'un méthyle sur la position 2 de la chaîne latérale de la thréonine (Tableau III-7-1).

La biosynthèse des nucléosides hn^6A et de ms^2hn^6A est inconnue. Si l'on élimine la possibilité d'une insertion spécifique de ces nucléosides modifiés lors de la synthèse de l'ARNt, ou le remplacement par excision d'une adénosine non modifiée sur l'ARNt lui-même, il ne reste pas d'autre possibilité que de faire intervenir des méthylases capables d'activer la position 2 de la thréonine. Afin de mieux comprendre la biosynthèse de ces nucléosides, trois hypothèses de travail ont été formulées.

Dans le premier cas, la méthylase est spécifique et réalise uniquement la méthylation de t^6A pour former hn^6A . La MTTase MtaB elle, ne serait pas spécifique et pourrait catalyser l'insertion du groupement thiométhyle sur la position 2 de l'adénosine appartenant aussi bien à t^6A qu'à hn^6A . Du fait que t^6A et hn^6A ont des structures très proches, il est tout à fait possible que la MTTase utilise indifféremment ces deux substrats.

Dans le deuxième cas, MtaB est spécifique et catalyse uniquement la thiométhylation de t^6A pour former ms^2t^6A . Dans ce cas, la méthylase ne serait pas spécifique c'est-à-dire qu'elle pourrait modifier respectivement t^6A et ms^2t^6A pour former hn^6A et ms^2hn^6A . De même que précédemment, il est possible que la méthylase ne différencie pas t^6A de ms^2t^6A .

Dans la troisième hypothèse MtaB est spécifique et catalyse t^6A en ms^2t^6A mais deux méthylases spécifiques sont nécessaires, l'une pour la formation de hn^6A à partir de t^6A et l'autre pour la production de ms^2hn^6A à partir de ms^2t^6A . Dans ces deux derniers cas, chaque nucléoside est synthétisé de bout en bout de façon spécifique.

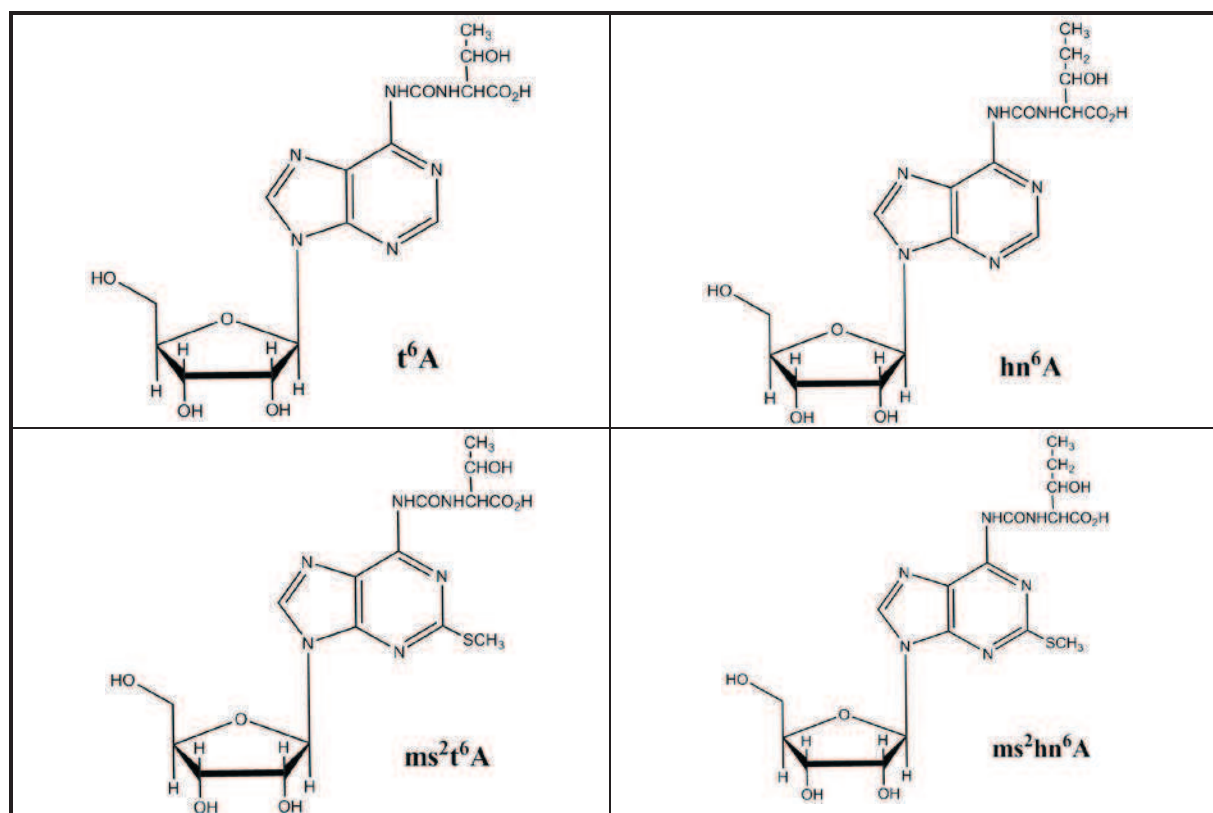


Tableau III-7-1 : Structure des nucléosides modifiés t^6A , hn^6A , ms^2t^6A et ms^2hn^6A .

Pour réaliser une méthylation sur la position 2 de la thréonine, l'enzyme doit pouvoir 1- activer une liaison C-H appartenant au groupement méthyle et 2- fournir un radical méthyl au substrat ainsi activé. Ces deux impératifs pourraient être remplis par une classe d'enzymes Radical-SAM possédant dans leur séquence primaire, outre le motif CX₃CX₂C, un motif conservé capable de reconnaître la méthylcobalamine connue comme précurseur de radical méthyle.

Des séquences de ce type sont connues, cependant très peu ont une fonction déterminée et aucune de ces enzymes n'a été caractérisée *in vitro*. Une enzyme de *C. crocatus* nommée CndI méthyle une liaison -OCH₃ en -OCH₂CH₃ dans des antibiotiques de la classe des chondrochlorens. Bien que cette enzyme n'ait pas été caractérisée *in vitro*, sa séquence primaire montre la présence du motif Radical-SAM et d'un motif de fixation de cobalamine (117).

III-7-2) Analyse du génome de *T. maritima*, clonage des deux méthylases TM0182 et TM0884.

L'analyse des séquences des protéines TM0182 et TM0884 indique qu'elles contiennent probablement un site de fixation de cobalamine. L'identification d'un tel site est réalisée automatiquement par la base de données Uniprot. Les deux gènes *tm0182* et *tm0884* ont été clonés dans le vecteur pT7-7 pour obtenir les plasmides TM0182-Tm-pT7-7 et TM0884-Tm-pT7-7 (M&M, Tableau II-2).

Après transformation de ces plasmides dans la souche *E. coli* BL21(DE3) RIL[®], différents tests de surexpression ont été réalisés. Ces tests se sont tous révélés négatifs et après extraction des tRNAs et analyse des nucléosides modifiés par HPLC, la présence de hn⁶A n'a pu être détectée. Pour tester les hypothèses développées ci-dessus, il est envisageable de cloner les gènes *tm0182* et *tm0884* dans le plasmide pDG148 de *B. subtilis* qui possède à la fois t⁶A et ms²t⁶A. D'autre part, ces mêmes expériences pourraient être menées dans la souche *B. subtilis* MGNA-C496 ne possédant plus ms²t⁶A afin de détecter la présence de hn⁶A. Ces expériences exploratoires pourraient amener des éléments de réponse sur la biosynthèse de hn⁶A et ms²hn⁶A mais on ne peut pas non plus exclure une méthylation de type RlmN ou Cfr dont les séquences protéiques ne contiennent qu'un site de Radical-SAM.

Conclusion Générale.

Comme beaucoup de modifications post-transcriptionnelles et post-traductionnelles, les modifications thiométhylées ne sont pas essentielles. On sait que certaines modifications post-transcriptionnelles présentes dans les ARNt pourraient avoir des fonctions de régulation dans des situations de stress (118) mais dans le cas des composés thiométhylés, la dynamique de la présence de ces modifications n'a pas été étudiée sauf partiellement dans une étude récente sur la MTTase MtaB (TmtB) *B. subtilis* (109). A l'inverse, une autre approche consiste à évaluer le rôle moléculaire de ces modifications. Cette approche bien moins spéculative que la précédente met en valeur le rôle de ces composés thiométhylés au niveau de traduction. Ainsi, bien qu'aucune fonction moléculaire n'ait été clairement identifiée pour la modification ms89 de S12, plusieurs publications ont montrées un lien entre mutation de résidus voisins, notamment le mutant K88R* (119), et l'apparition de résistance à la streptomycine. L'analyse de la structure du ribosome obtenue par Andrew P. Carter *et al.* en présence de streptomycine (120) révèle que ms89 pourrait intervenir dans la reconnaissance de l'adénosine 523 de l'ARN ribosomale 16S (Cf Annexe 1) et ainsi structurer cette boucle de l'ARNr avec la m⁷G527 (Cf Annexe 2-B). Plus généralement, la présence de mutations dans la protéine ribosomale S12 altère la traduction et a de multiples effets sur l'efficacité de la traduction (121). Enfin, il a été montré récemment que la protéine RRF (Ribosome Recycling Factor) établit des contacts avec la protéine ribosomale S12 permettant à celle-ci de participer à l'expulsion des ARNt déacylés (122).

Par ailleurs, une étude cristallographique récente montre que la présence de ms²i⁶A au niveau de l'anticodon permet à la fois de structurer celui-ci et d'intervenir dans la reconnaissance codon/anticodon (123) (Cf Annexe 2-A/C). De nombreuses publications ont montré un lien direct entre absence de ms²i⁶A et augmentation des erreurs de traduction. De la même manière, nous l'avons vu dans le chapitre III, l'absence de ms²t⁶A augmenterait le risque de développer un diabète de type 2.

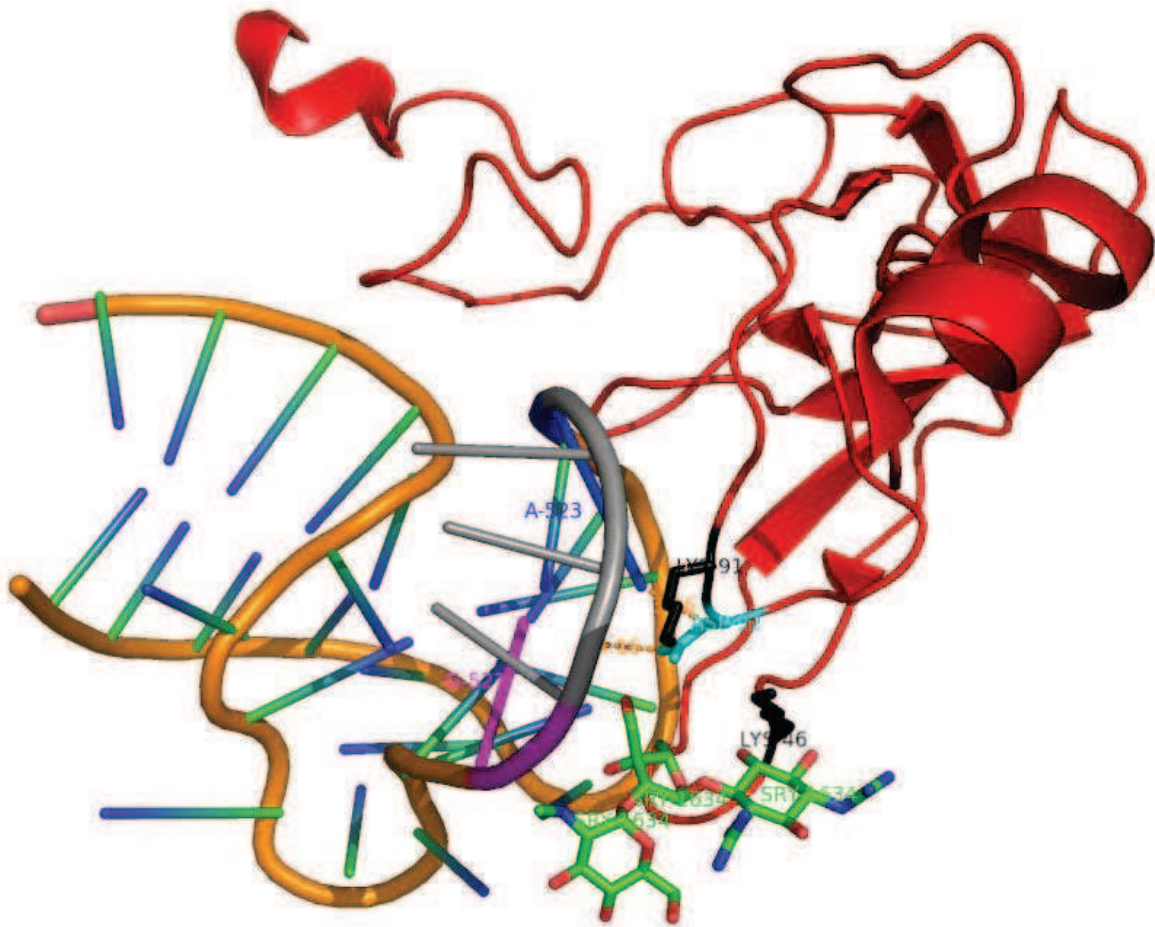
La biosynthèse de ces composés thiométhylés nécessite des enzymes extrêmement spécifiques (MTTases) qui catalysent ces réactions par une chimie radicalaire. L'existence de ces systèmes enzymatiques complexes montre que ces thiométhylations sont importantes pour contrôler l'efficacité de la traduction et que les différents règnes du vivant les ont très

* K87R sans la méthionine initiale.

certainement conservés pour cette raison. Au cours de ce manuscrit, nous avons étudié l'insertion de soufre par voie radicalaire sur ces systèmes afin de mieux comprendre leurs mécanismes réactionnels. Ces travaux ont permis de démontrer pour la première fois, que le soufre inséré lors de la catalyse, ne provient pas de la dégradation d'un centre [Fe-S] mais d'un soufre terminal coordonné sur celui-ci. Ainsi, les holo-MTTases sont actives lorsqu'elles possèdent deux centres [4Fe-4S]. De ce fait, le deuxième centre ne doit plus être considéré comme un co-substrat de la réaction mais bien comme un cofacteur nécessaire à l'enzyme.

Les résultats obtenus avec les MTTases permettent d'envisager de nouveaux mécanismes réactionnels pour les autres systèmes impliqués dans l'insertion de soufre par voie radicalaire. Nous avons vu que l'ensemble des enzymes de cette sous-classe possède deux centres [Fe-S] et s'il est acquis que le centre Radical-SAM est impliqué dans la formation du radical 5'-désoxyadénosyle, les expériences réalisées sur l'holo-RimO et l'holo-MiaB montrent que le deuxième centre appelé « site soufre » pourrait activer le soufre de manière radicalaire. Bien que les preuves de l'existence de cet intermédiaire radicalaire soufré restent à apporter, il est tentant de proposer l'existence d'un tel intermédiaire dans le « site soufre » des biotine et lipoate synthases. Aucune expérience dans la littérature n'est en contradiction avec l'existence de ce type d'intermédiaire. Alors que, dans la biotine synthase, un atome de soufre pourrait être activé sur le centre [2Fe-2S], on pourrait envisager que la lipoate synthase puisse activer non pas un ion sulfure mais plutôt un ion persulfure permettant l'insertion directe des deux atomes de soufre simultanément. Cependant, comme l'a dit Arthur Kornberg, il ne faut pas croire que quelque chose est juste parce qu'on peut l'expliquer (124) et donc, il faut espérer que ces travaux servent de base pour poursuivre les études de ces systèmes enzymatiques fascinants que sont les MTTases.

Annexe 1 :



Annexe 1 : Structure de la protéine ribosomale S12 (rouge) ainsi que d'une petite portion de l'ARN ribosomale 16S (A510-A540) en présence de la streptomycine (vert) (PDB 1FJG) (120). Les lysines 91* et 46* de la protéine ribosomale S12 (noir) interviennent dans la fixation de la streptomycine. L'asparate 92 de la protéine ribosomale S12 (cyan), cible de la MTTase RimO est modélisé sans son groupement thiométhyle.

* D'après Uniprot ces acides aminés correspondent à : K88, K43, D89.

Annexe 2 :



Annexe 2 : Positionnement de deux ARNt^{Phe} (Cyan, Orange) dans les sites A et T au sein du ribosome procaryote lors de la reconnaissance l'anticodon du codon sur l'ARN messenger (Bleu); La protéine ribosomale S12 (rouge) est en interaction avec l'ARN ribosomale et ARN messenger (PDB :3IZV) (125).

Références bibliographiques.

1. Ben-Shem A, Jenner L, Yusupova G, & Yusupov M (2010) *Science* **330**, 1203-1209.
2. Williamson JR (2009) *Cell* **139**, 1041-1043.
3. Schuwirth BS, Borovinskaya MA, Hau CW, Zhang W, Vila-Sanjurjo A, Holton JM, & Cate JHD (2005) *Science* **310**, 827-834.
4. Beringer M (2008) *Rna-a Publication of the Rna Society* **14**, 795-801.
5. Helm M & Motorin Y (2010) *Biochemistry* **49**, 4934-4944.
6. Kessler D (2006) *Fems Microbiology Reviews* **30**, 825-840.
7. Sekowska A, Kung HF, & Danchin A (2000) *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **2**, 145-177.
8. Levy S & Danchin A (1988) *Molecular Microbiology* **2**, 777-783.
9. Park S & Imlay JA (2003) *Journal of Bacteriology* **185**, 1942-1950.
10. Ignoul S & Eggermont J (2005) *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **289**, C1369-C1378.
11. Esaki N, Hidese R, & Mihara H (2011) *Applied Microbiology and Biotechnology* **91**, 47-61.
12. Awano N, Wada M, Mori H, Nakamori S, & Takagi H (2005) *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 4149-4152.
13. Szabo C (2007) *Nature Reviews Drug Discovery* **6**, 917-935.
14. Beinert H (2000) *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **5**, 2-15.
15. Fontecave M & Ollagnier-De-Choudens S (2008) *Archives of Biochemistry and Biophysics* **474**, 226-237.
16. Volbeda A, Charon MH, Piras C, Hatchikian EC, Frey M, & Fontecillacamps JC (1995) *Nature* **373**, 580-587.
17. Peters JW, Lanzilotta WN, Lemon BJ, & Seefeldt LC (1998) *Science* **282**, 1853-1858.
18. Dementin S, Belle V, Bertrand P, Guigliarelli B, Adryanczyk-Perrier G, De Lacey AL, Fernandez VM, Rousset M, & Leger C (2006) *Journal of the American Chemical Society* **128**, 5209-5218.
19. Martins BM, Dobbek H, Cinkaya I, Buckel W, & Messerschmidt A (2004) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 15645-15649.
20. Beinert H, Holm RH, & Munck E (1997) *Science* **277**, 653-659.
21. Lee TT, Agarwalla S, & Stroud RM (2004) *Structure* **12**, 397-407.
22. Lee TT, Agarwalla S, & Stroud RM (2005) *Cell* **120**, 599-611.
23. Beinert H, Kennedy MC, & Stout CD (1996) *Chemical Reviews* **96**, 2335-2373.
24. Tchong SI, Xu HM, & White RH (2005) *Biochemistry* **44**, 1659-1670.
25. Guijarro JA, Mendez J, Reimundo P, Perez-Pascual D, Navais R, & Gomez E (2011) *Journal of Bacteriology* **193**, 944-951.
26. Dobbek H, Knauer SH, & Buckel W (2011) *Journal of the American Chemical Society* **133**, 4342-4347.
27. Kim J, Darley D, & Buckel W (2005) *Febs Journal* **272**, 550-561.
28. Mueller EG (2006) *Nature Chemical Biology* **2**, 185-194.
29. Mueller EG, Palenchar PM, & Buck CJ (2001) *Journal of Biological Chemistry* **276**, 33588-33595.
30. Kambampati R & Lauhon CT (2000) *Journal of Biological Chemistry* **275**, 10727-10730.
31. Cantoni GL (1975) *Annual Review of Biochemistry* **44**, 435-451.

32. Fontecave M, Atta M, & Mulliez E (2004) *Trends in Biochemical Sciences* **29**, 243-249.
33. Carell T, Munzel M, Globisch D, Bruckl T, Wagner M, Welzmler V, Michalakakis S, Muller M, & Biel M (2010) *Angewandte Chemie-International Edition* **49**, 5375-5377.
34. Booker SJ (2009) *Current Opinion in Chemical Biology* **13**, 58-73.
35. Marsh ENG, Patterson DP, & Li L (2010) *Chembiochem* **11**, 604-621.
36. Sofia HJ, Chen G, Hetzler BG, Reyes-Spindola JF, & Miller NE (2001) *Nucleic Acids Res* **29**, 1097-1106.
37. McGlynn SE, Boyd ES, Shepard EM, Lange RK, Gerlach R, Broderick JB, & Peters JW (2010) *Journal of Bacteriology* **192**, 595-598.
38. Hanzelmann P & Schindelin H (2004) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 12870-12875.
39. Hanzelmann P & Schindelin H (2006) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 6829-6834.
40. Lees NS, Hanzelmann P, Hernandez HL, Subramanian S, Schindelin H, Johnson MK, & Hoffman BM (2009) *Journal of the American Chemical Society* **131**, 9184-+.
41. Grove TL, Ahlum JH, Sharma P, Krebs C, & Booker SJ (2010) *Biochemistry* **49**, 3783-3785.
42. Marquet A, Bui BTS, & Florentin D (2001) *Vitamins and Hormones - Advances in Research and Applications, Vol 61* **61**, 51-101.
43. Berkovitch F, Nicolet Y, Wan JT, Jarrett JT, & Drennan CL (2004) *Science* **303**, 76-79.
44. Jarrett JT & Broach RB (2006) *Biochemistry* **45**, 14166-14174.
45. Jarrett JT & Farrar CE (2009) *Biochemistry* **48**, 2448-2458.
46. Jarrett JT, Farrar CE, Siu KKW, & Howell PL (2010) *Biochemistry* **49**, 9985-9996.
47. Ugulava NB, Gibney BR, & Jarrett JT (2001) *Biochemistry* **40**, 8343-8351.
48. Jameson GNL, Cosper MM, Hernandez HL, Johnson MK, & Huynh BH (2004) *Biochemistry* **43**, 2022-2031.
49. Ugulava NB, Sacanell CJ, & Jarrett JT (2001) *Biochemistry* **40**, 8352-8358.
50. Bui BTS, Lotierzo M, Escalettes F, Florentin D, & Marquet A (2004) *Biochemistry* **43**, 16432-16441.
51. Jarrett JT, Taylor AM, & Farrar CE (2008) *Biochemistry* **47**, 9309-9317.
52. Bui BTS, Mattioli TA, Florentin D, Bolbach G, & Marquet A (2006) *Biochemistry* **45**, 3824-3834.
53. Choi-Rhee E & Cronan JE (2005) *Chemistry & Biology* **12**, 461-468.
54. Marquet A, Bui BTS, Smith AG, & Warren MJ (2007) *Natural Product Reports* **24**, 1027-1040.
55. Koike M & Reed LJ (1960) *Journal of Biological Chemistry* **235**, 1931-1938.
56. Reed LJ & Hackert ML (1990) *Journal of Biological Chemistry* **265**, 8971-8974.
57. Miller JR, Busby RW, Jordan SW, Cheek J, Henshaw TF, Ashley GW, Broderick JB, Cronan JE, & Marletta MA (2000) *Biochemistry* **39**, 15166-15178.
58. Cronan JE & Christensen QH (2010) *Biochemistry* **49**, 10024-10036.
59. Cicchillo RM, Lee KH, Baleanu-Gogonea C, Nesbitt NM, Krebs C, & Booker SJ (2004) *Biochemistry* **43**, 11770-11781.
60. Cicchillo RM, Iwig DF, Jones AD, Nesbitt NM, Baleanu-Gogonea C, Souder MG, Tu L, & Booker SJ (2004) *Biochemistry* **43**, 6378-6386.
61. Nesbitt NM, Baleanu-Gogonea C, Cicchillo RM, Goodson K, Iwig DF, Broadwater JA, Haas JA, Fox BG, & Booker SJ (2005) *Protein Expression and Purification* **39**, 269-282.

62. Booker SJ, Cicchillo RM, & Grove TL (2007) *Current Opinion in Chemical Biology* **11**, 543-552.
63. Yamaizumi Z, Kuchino Y, Harada F, Nishimura S, & McCloskey JA (1980) *Journal of Biological Chemistry* **255**, 2220-2225.
64. Grosjean H, Nicoghossian K, Haumont E, Soll D, & Cedergren R (1985) *Nucleic Acids Research* **13**, 5697-5706.
65. Gefter ML (1969) *Biochemical and Biophysical Research Communications* **36**, 435-&.
66. Ericson JU & Bjork GR (1986) *Journal of Bacteriology* **166**, 1013-1021.
67. Esberg B, Leung HCE, Tsui HCT, Bjork GR, & Winkler ME (1999) *Journal of Bacteriology* **181**, 7256-7265.
68. Pierrel F, Bjork GR, Fontecave M, & Atta M (2002) *Journal of Biological Chemistry* **277**, 13367-13370.
69. Pierrel F, Hernandez HL, Johnson MK, Fontecave M, & Atta M (2003) *Journal of Biological Chemistry* **278**, 29515-29524.
70. Pierrel F, Douki T, Fontecave M, & Atta M (2004) *Journal of Biological Chemistry* **279**, 47555-47563.
71. Hernandez HL, Pierrel F, Elleingand E, Garcia-Serres R, Huynh BH, Johnson MK, Fontecave M, & Atta M (2007) *Biochemistry* **46**, 5140-5147.
72. Kowalak JA & Walsh KA (1996) *Protein Science* **5**, 1625-1632.
73. Anton BP, Saleh L, Benner JS, Raleigh EA, Kasif S, & Roberts RJ (2008) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 1826-1831.
74. Fontecave M, Mathevon C, Pierrel F, Oddou JL, Garcia-Serres R, Blonclin G, Latour JM, Menage S, Gambarelli S, & Atta M (2007) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 13295-13300.
75. Reddy DM, Crain PF, Edmonds CG, Gupta R, Hashizume T, Stetter KO, Widdel F, & McCloskey JA (1992) *Nucleic Acids Res* **20**, 5607-5615.
76. Vold BS & Green CJ (1986) *Journal of Bacteriology* **166**, 306-312.
77. Vold BS, Keith DE, Buck M, McCloskey JA, & Pang H (1982) *Nucleic Acids Research* **10**, 3125-3132.
78. Jayabaskaran C & Puttaraju M (1994) *Biochemistry and Molecular Biology International* **33**, 1237-1247.
79. Sundaram M, Durant PC, & Davis DR (2000) *Biochemistry* **39**, 12575-12584.
80. Nagan MC, McCrate NE, Varner ME, & Kim KI (2006) *Nucleic Acids Research* **34**, 5361-5368.
81. Sternglanz R, Srinivasan M, Mehta P, Yu Y, Prugar E, Koonin EV, & Karzai AW (2011) *Embo Journal* **30**, 873-881.
82. Dageron MC, Lenstra TL, Frizzarin M, El Yacoubi B, Liu X, Baudin-Baillieu A, Lijnzaad P, Decourty L, Saveanu C, Jacquier A, *et al.* (2011) *Nucleic Acids Res.*
83. Erauso G, Reysenbach AL, Godfroy A, Meunier JR, Crump B, Partensky F, Baross JA, Marteinsson V, Barbier G, Pace NR, *et al.* (1993) *Archives of Microbiology* **160**, 338-349.
84. Kaelin WG, Krek W, Sellers WR, Decaprio JA, Ajchenbaum F, Fuchs CS, Chittenden T, Li Y, Farnham PJ, Blancar MA, *et al.* (1992) *Cell* **70**, 351-364.
85. Joseph P, Fantino JR, Herbaud ML, & Denizot F (2001) *Fems Microbiology Letters* **205**, 91-97.
86. Yang MM, Zhang WW, Bai XT, Li HX, & Cen PL (2010) *Molecular Biology Reports* **37**, 2207-2213.
87. Studier FW & Moffatt BA (1986) *Journal of Molecular Biology* **189**, 113-130.

88. Lee KH, Saleh L, Anton BP, Madinger CL, Benner JS, Iwig DF, Roberts RJ, Krebs C, & Booker SJ (2009) *Biochemistry* **48**, 10162-10174.
89. Fish WW (1988) *Methods in Enzymology* **158**, 357-364.
90. Beinert H (1983) *Analytical Biochemistry* **131**, 373-378.
91. Then J & Truper HG (1983) *Archives of Microbiology* **135**, 254-258.
92. Gehrke CW & Kuo KC (1989) *Journal of Chromatography* **471**, 3-36.
93. Gambarelli S, Mulliez E, & Fontecave M (2010) *Biol Magn Reson* **29**, 53-75.
94. Anantharaman V, Koonin EV, & Aravind L (2001) *Fems Microbiology Letters* **197**, 215-221.
95. Vey JL, Yang J, Li M, Broderick WE, Broderick JB, & Drennan CL (2008) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 16137-16141.
96. Walters EM, Garcia-Serres R, Jameson GNL, Glauser DA, Bourquin F, Manieri W, Schurmann P, Johnson MK, & Huynh BH (2005) *Journal of the American Chemical Society* **127**, 9612-9624.
97. Yang J, Naik SG, Ortillo DO, Garcia-Serres R, Li M, Broderick WE, Huynh BH, & Broderick JB (2009) *Biochemistry* **48**, 9234-9241.
98. Nicolet Y, Rubach JK, Posewitz MC, Amara P, Mathevon C, Atta M, Fontecave M, & Fontecilla-Camps JC (2008) *Journal of Biological Chemistry* **283**, 18861-18872.
99. Layer G, Moser J, Heinz DW, Jahn D, & Schubert WD (2003) *Embo Journal* **22**, 6214-6224.
100. Lepore BW, Ruzicka FJ, Frey PA, & Ringe D (2005) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 13819-13824.
101. Cicchillo RM & Booker SJ (2005) *Journal of the American Chemical Society* **127**, 2860-2861.
102. Booker SJ, Grove TL, Benner JS, Radle MI, Ahlum JH, Landgraf BJ, & Krebs C (2011) *Science* **332**, 604-607.
103. Booker SJ, Boal AK, Grove TL, McLaughlin MI, Yennawar NH, & Rosenzweig AC (2011) *Science* **332**, 1089-1092.
104. Hioe J & Zipse H (2010) *Faraday Discussions* **145**, 301-313.
105. Chimnaronk S, Forouhar F, Sakai J, Yao M, Tron CM, Atta M, Fontecave M, Hunt JF, & Tanaka I (2009) *Biochemistry* **48**, 5057-5065.
106. Durant PC, Bajji AC, Sundaram M, Kumar RK, & Davis DR (2005) *Biochemistry* **44**, 8078-8089.
107. McCrate NE, Varner ME, Kim KI, & Nagan MC (2006) *Nucleic Acids Research* **34**, 5361-5368.
108. Strader MB, Costantino N, Elkins CA, Chen CY, Patel I, Makusky AJ, Choy JS, Court DL, Markey SP, & Kowalak JA (2011) *Molecular & Cellular Proteomics* **10**.
109. Anton BP, Russell SP, Vertrees J, Kasif S, Raleigh EA, Limbach PA, & Roberts RJ (2010) *Nucleic Acids Research* **38**, 6195-6205.
110. Hughes TE, Saxena R, Voight BF, Lyssenko V, Burtt NP, de Bakker PIW, Chen H, Roix JJ, Kathiresan S, Hirschhorn JN, *et al.* (2007) *Science* **316**, 1331-1336.
111. Boehnke M, Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL, Willer CJ, Li Y, Duren WL, Erdos MR, Stringham HM, Chines PS, *et al.* (2007) *Science* **316**, 1341-1345.
112. Stefansson K, Steinthorsdottir V, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Jonsdottir T, Walters GB, Styrkarsdottir U, Gretarsdottir S, Emilsson V, *et al.* (2007) *Nature Genetics* **39**, 770-775.
113. Zeggini E (2007) *Science* **317**, 1036-1036.
114. Walker M, Pascoe L, Tura A, Patel SK, Ibrahim IM, Ferrannini E, Zeggini E, Weedon MN, Mari A, Hattersley AT, *et al.* (2007) *Diabetes* **56**, 3101-3104.

115. Kato N, Takeuchi F, Serizawa M, Yamamoto K, Fujisawa T, Nakashima E, Ohnaka K, Ikegami H, Sugiyama T, Katsuya T, *et al.* (2009) *Diabetes* **58**, 1690-1699.
116. Ohara-Imaizumi M, Yoshida M, Aoyagi K, Saito T, Okamura T, Takenaka H, Akimoto Y, Nakamichi Y, Takanashi-Yanobu R, Nishiwaki C, *et al.* (2010) *Plos One* **5**.
117. Muller R, Rachid S, Scharfe M, Blocker H, & Weissman KJ (2009) *Chemistry & Biology* **16**, 70-81.
118. Yi C & Pan T *Acc Chem Res.*
119. Jogl G, Gregory ST, Demirci H, Belardinelli R, Monshupanee T, Gualerzi C, & Dahlberg AE (2009) *Rna-a Publication of the Rna Society* **15**, 1693-1704.
120. Carter AP, Clemons WM, Brodersen DE, Morgan-Warren RJ, Wimberly BT, & Ramakrishnan V (2000) *Nature* **407**, 340-348.
121. Agarwal D, Gregory ST, & O'Connor M *J Mol Biol* **410**, 1-9.
122. Dunkle JA, Wang L, Feldman MB, Pulk A, Chen VB, Kapral GJ, Noeske J, Richardson JS, Blanchard SC, & Cate JH *Science* **332**, 981-984.
123. Yusupova G, Jenner LB, Demeshkina N, & Yusupov M (2010) *Nature Structural & Molecular Biology* **17**, 555-U548.
124. Kornberg A (2003) *Trends in Biochemical Sciences* **28**, 515-517.
125. Frank J, Agirrezabala X, Schreiner E, Trabuco LG, Lei JL, Ortiz-Meoz RF, Schulten K, & Green R (2011) *Embo Journal* **30**, 1497-1507.